

Untersuchung der Bindung zwischen bakteriellen Polysacchariden und Schwermetallionen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

an der Fakultät Chemie
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Dirk Bergmann
aus Duisburg

Referent: Prof. Dr. C. Mayer

Koreferent: Prof. Dr. T. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2006 bis Juli 2010 im Fachgebiet der Physikalischen Chemie an der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. C. Mayer angefertigt.

Es ist nicht genug, zu wissen

- man muss es auch anwenden.

Es ist nicht genug, zu wollen

- man muss es auch tun!

Johann Wolfgang von Goethe

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Mayer für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die fortwährende Unterstützung und Motivation, sowie für sein großes Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. T. Schmidt für die Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Manfred Zähres möchte ich mich für die stete Unterstützung bei den Aufnahmen der NMR-Spektren bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Alina Leson dafür bedanken, dass sie mir immer wieder hilfreiche Anregungen und Denkanstöße geliefert hat, obwohl sie im Laufe meiner Arbeit leider nicht mehr unserer Arbeitsgruppe angehörte.

Frau Dipl.-Chem. Anna Zellermann möchte ich dafür danken, dass sie immer wieder diese Arbeit korrigiert hat und mir so hilfreiche Anregungen geliefert hat.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der PC, die nicht namentlich erwähnt wurden, für ihre hilfreichen Diskussionen und die freundliche Atmosphäre bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Last but not least:

Die Dankbarkeit die ich meiner Frau Heike und meinen Kindern Anika und Janik schulde kann ich hier gar nicht zum Ausdruck bringen. Ohne die Unterstützung meiner Frau Heike wäre ich nie so weit gekommen. Ich danke Dir für diese Unterstützung, deine Aufmunterungen und dein immer währendes Interesse an meiner Arbeit, auch wenn Du nicht immer alles verstanden hast.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Biofilme und ihre Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS)	4
2.1.1 Aquatische Biofilme	4
2.1.2 Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS) von Biofilmen	6
2.2 Struktur und Eigenschaften von Polysacchariden	9
2.2.1 Polyelektrolyte.....	13
2.2.2 Alginate	15
2.2.3 Dextran	16
2.2.3 Hyaluronsäure.....	17
2.2.4 Xanthan.....	20
2.2.5 Wechselwirkungen zwischen bivalenter Kationen und Alginat: Das „Egg-Box“-Modell.....	21
2.3 Schwermetalle	24
2.4 Verwendete Methoden zur Charakterisierung der Polysaccharide	26
2.4.1 Konduktometrie	26
2.4.2 Viskosimetrie.....	30
2.4.3 Rastersondenmikroskopie.....	39
2.4.4 NMR-Spektroskopie	42
3 Material	45
3.1 Bakterielle Polysaccharide.....	45
3.2 Chemikalien	46
3.3 Geräte	47
4 Experimenteller Teil.....	48
4.1 Reinigung der Polysaccharide	48
4.1.1 Reinigung von Hyaluronsäure	48
4.1.2 Reinigung von Xanthan	49
4.2 Konduktometrische Titration.....	49
4.3 Rotationsviskosimetrische Titration	52
4.4 Atomare Kraft-Mikroskopie (AFM).....	54
4.5 NMR-Spektroskopie.....	55

5 Ergebnisse.....	56
5.1 Konduktometrie.....	56
5.1.1 Leitfähigkeitsmessung von Dextran	56
5.1.2 Leitfähigkeitsmessung von Hyaluronsäure	57
5.1.3 Leitfähigkeitsmessung von Xanthan	63
5.2 Rotationsviskosimetrie	68
5.2.1 Viskositätsmessungen von Dextran.....	68
5.2.2 Viskositätsmessungen von Hyaluronsäure	69
5.2.3 Viskositätsmessungen von Xanthan	74
5.3 Atomare Kraft-Mikroskopie (AFM).....	78
5.3.1 Charakterisierung von Hyaluronsäure mittels AFM	80
5.3.2 Charakterisierung von Xanthan mittels AFM	84
5.4 NMR-Spektroskopie	87
5.4.1 Charakterisierung von Hyaluronsäure mittels NMR-Spektroskopie.....	88
5.4.2 Charakterisierung von Xanthan mittels NMR-Spektroskopie.....	93
5.4.3 Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Hyaluronsäure und bivalenten Kationen.....	96
5.4.4 Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Xanthan und bivalenten Kationen.....	100
6 Diskussion.....	104
6.1 Verhalten der Polysaccharide in Abwesenheit von mehrwertigen (Schwer-) Metallkationen.....	104
6.1.1 Ziel der Untersuchungen	104
6.1.2 Vorbereiten der Polymerproben	104
6.1.3 Dextran	105
6.1.4 Hyaluronsäure.....	106
6.1.5 Xanthan.....	110
6.2 Wechselwirkungen zwischen Polysacchariden und Schwermetall-kationen	113
6.2.1 Dextran	115
6.2.2 Hyaluronsäure.....	117
6.2.3 Xanthan.....	123
7 Zusammenfassung	131
8 Literatur	134

9 Anhang.....	138
Anhang A - Abbildungsverzeichnis.....	138
Anhang B - Tabellenverzeichnis.....	142
Anhang C - Messergebnisse	144
Konduktometrie	144
Anpassungsfunktionen für Konduktometrie.....	153
Rotationsviskosimetrie	156
CURRICULUM VITAE	165
Selbstständigkeitserklärung	169

1 Einleitung

Obwohl Bakterien in der Lage sind frei, also in einem „planktonischen Zustand“, zu existieren, liegt die Mehrheit aller Mikroorganismen auf der Erde in Form von so genannten Biofilmen vor. Darunter versteht man mikrobielle Konsortien wie Filme, Schleime, Schlämme und Flocken, die sich an Grenzflächen zu wässrigen Phasen befinden^[1, 2]. Aufgrund des Umstandes, dass die Biofilme im ständigen Kontakt zu einem wässrigen Medium stehen, haben sie einen gravierenden Einfluss auf natürliche und technische Prozesse. Aus der menschlichen Perspektive betrachtet können diese sowohl nützliche als auch schädigende Auswirkungen aufweisen.

Auf Grund dieser Vielzahl von Möglichkeiten liegt es nahe, dass ein großes Interesse darin besteht, die mechanischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der Biofilme zu klären.

Biofilme setzen sich hauptsächlich aus Wasser (bis zu 95% des Feuchtgewichts), extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Mikroorganismen zusammen^[3]. Die Matrix der Biofilme, welche die EPS darstellen, besteht hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen und geringeren Anteilen anderer Biopolymere, die von Bakterien oder Algen gebildet werden^[4]. Die EPS liefern den Hauptanteil des gesamten organischen Kohlenstoffs der Biomasse und spielen somit eine Schlüsselrolle für die physikalischen Eigenschaften der Biofilme. Die EPS-Matrix dient den Mikroorganismen als Schutz, hält die Zellen zusammen und versorgt die Mikroorganismen mit Nährstoffen und Spurenelementen. Alle Organismen, so auch biofilmbildende Bakterien, benötigen neben Stickstoff- und Kohlenstoffquellen (Makronährstoffe) Spuren- oder Mikronährstoffe für ihre Entwicklung. Zu den Spurenelementen gehören eine Reihe von Metallen, die aufgrund ihrer Dichte von ca. $4,5 \text{ g/cm}^3$ und höher zu den Schwermetallen gezählt werden. Die meisten Schwermetalle sind Übergangsmetalle mit unvollständig aufgefüllten d-Orbitalen. Diese d-Orbitale sind die Ursache, dass Schwermetallionen eine Reihe von Komplexen bilden können, die teilweise redoxaktive Fähigkeiten besitzen^[5]. Sowohl essentielle als auch nichtessentielle Schwermetalle wirken in Abhängigkeit von der Konzentration als Zellgifte. So kann ein Überschuss an Eisen oder Kupfer die Bindung von reaktiven Sauerstoffspezies über die Fentonreaktion verursachen, die dazu führen, dass biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine oder Lipide durch Oxidation zerstört werden^[6, 7]. Außerdem können andere Schwermetalle an wichtige Domänen innerhalb der Enzyme binden, wodurch deren Funktion

inhibiert wird und was infolge dessen den gesamten Stoffwechsel beeinflusst. Diese Deaktivierung wird häufig durch die hohe Affinität zu Amino-Carboxylgruppen verursacht. Um dem entgegen zu wirken, haben Mikroorganismen in Biofilmen eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um sich vor einer Schwermetalltoxizität zu schützen. Die Metallbindung an extrazellulären Präzipitaren stellt einen ersten Schutzmechanismus nach außen hin dar. Zu dieser Substanzgruppe gehören die oben genannten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) ^[8]. Um die Wechselwirkungen von Biofilmen mit Schwermetallen und die damit verbundene Änderung der physikalischen Eigenschaften insbesondere durch die Wechselwirkung mit zweiwertigen Metallionen besser zu verstehen, werden von Bakterien exprämierte Polysaccharide wie Alginat, Dextran, Hyaluronsäure und Xanthan intensiv untersucht.

Am besten verstanden sind bisher die Wechselwirkungen zwischen Polysacchariden des Algenalginats und bivalenten Kationen. Eine genaue Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Calciumionen und dem Alginat stellt das so genannte „Egg-Box“-Modell dar ^[9]. Dieses Modell besagt, dass die Bildung von Gelnetzwerken im Alginat durch die Entstehung chelat-ähnlicher Komplexe zwischen den Ca^{2+} -Ionen und den Polyguluronatblöcken (G-Blöcke) zustande kommt. Im Gegensatz zu den Algenalginaten weisen die Bakterienalginat eine andere Blockstruktur auf, denn bei den Polysacchariden der Bakterienalginat fehlen die Polyguluronatblöcke (G-Blöcke) vollständig und es sind nur Polymannuronatblöcke (M-Blöcke) vorhanden. Trotzdem tritt bei den Bakterienalginaten in Anwesenheit von Ca^{2+} oder anderen bivalenten Kationen eine ähnliche Gelbildung auf wie bei den Algenalginaten. Diese Beobachtungen können nicht mit den „Egg-Box“-Modell erklärt werden, da hier die G-Blöcke komplett fehlen. ^[10] Vorangegangene Arbeiten weisen darauf hin, dass die auftretenden Vernetzungen über MG-Paarungen innerhalb der Kettezustande kommen.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen die Wechselwirkungen von zwei- und dreiwertigen Metall- bzw. Schwermetall-Kationen mit verzweigten Polysacchariden. Unter Zuhilfenahme der Konduktometrie können charakteristische Struktureigenschaften wie die Stöchiometrie zwischen den Metallionen und den Monomereinheiten der Polymere sowie die Stabilität der Komplexe an Hand der $\Delta\kappa^*$ -Werte bestimmt werden. Durch die Methode der Rotationsviskosimetrie kann eine Aussage über die Tertiärstruktur der Polysaccharide in wässriger Lösung gemacht werden. Weiteren Aufschluss über die Strukturänderung durch die Bildung der Metall-Polymer-Komplexe liefert die AFM-Spektroskopie. Die 1D- bzw.

2D-NMR-Spektroskopie ist ein probates Mittel zur Untersuchung von langkettigen Kohlenhydraten. Damit ist es möglich, während einer NMR-Messung die unmittelbare Umgebung eines komplexierten mehrwertigen Kations zu ergründen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Biofilme und ihre Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS)

2.1.1 Aquatische Biofilme

Biofilme stellen die älteste bislang bekannte Form von Lebensgemeinschaften dar^[11], in denen etwa 99% der auf der Erde lebenden Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Algen, Protozoen oder Pilze) vorkommen^[12]. Der Biofilm stellt eine Schicht aus lebenden und abgestorbenen Kleinstlebewesen in einer gelartigen Matrix dar. Er ist eine mikrobielle Lebensgemeinschaft an den verschiedensten Grenzflächen (Gas-/Flüssigphase, Flüssig-/Festphase oder Flüssig-/Flüssigphase), an denen entsprechende Bedingungen herrschen, welche mikrobielles Wachstum erlauben. Allen Biofilmen ist gemein, dass die Mikroorganismen für einen relativ langen Zeitraum in einer großen räumlichen Nähe zueinander in einer stark hydratisierten Matrix, den extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), eingebettet sind^[13]. Mit dem Ausdruck Biofilm werden schleimähnliche (Film-) Strukturen, aber auch Flocken und Schlämme bezeichnet, wobei die Schlämme durch besonders dicke Schichten charakterisiert sind. Biofilme bilden sich in der Natur unter anderem im Boden, in Gewässersedimenten oder auf Gesteinsoberflächen. Sie kommen aber auch in technischen Systemen vor. Man unterteilt die Biofilme aus technischer Sicht in zwei Kategorien, die erwünschten und die unerwünschten. Zu den erwünschten zählen z.B. Biofilme in Kläranlagen oder Bioreaktoren. Unerwünschte Biofilme treten unter anderem in Trinkwasserbehältern und -leitungen, Kraftwerken oder an Schiffsrümpfen auf.

Eines der möglichen technischen Anwendungsgebiete dieser Lebensgemeinschaften liegt in der Abwasserreinigung. Dort kommen unterschiedliche Technologien zum Einsatz, welche nach dem jeweiligen verwendeten Reaktortyp benannt sind, z.B. Membranreaktor, Scheibentropfkörper- oder Tropfkörperreaktor. Bei der Behandlung von schwer abbaubaren Substanzen^[14], bei der Abluft-Reinigung^[15] und beim Abbau fester Abfälle kommen fixierte Mikroorganismen zum Einsatz. Die Vorteile der technischen Nutzung immobilisierter Mikroorganismen liegen in der Rückhaltung der Biomasse und einer wesentlich verlängerten stoffwechselphysiologischen Aktivität^[16].

Unerwünschte Biofilme verursachen in vielen Bereichen enorme Kosten. So können sie sich beispielsweise in Wärmetauschern von großtechnischen Anlagen bilden, wodurch die Wärmeregulation gestört wird. Dies verursacht Kosten während des laufenden Betriebs, aber auch durch Stillstandzeiten, die für Reinigungsmaßnahmen benötigt werden. Ebenfalls

Probleme bereitet der Biofilmbewuchs in Reinluftsystemen. Dabei treten immer wieder mikrobielle Kontaminationen auf. Diese Systeme werden zum Beispiel bei der Herstellung von Computerchips eingesetzt, bei welcher Keimfreiheit gewährleistet sein muss.

Schon kurzzeitige Phasen, in denen die Umgebung nicht steril ist, führen dabei zum kompletten Ausschluss einer ganzen Charge.

Der Hauptbestandteil des Biofilms stellt mit ca. 98% des Feuchtgewichts das Wasser dar. Dieses bildet in Verbindung mit den Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS), die von den Mikroorganismen ausgeschieden werden, Hydrogele, so dass eine schleimartige Matrix entsteht. Ein Modell eines aquatischen Biofilms wird in der Abbildung 2.1 gezeigt.

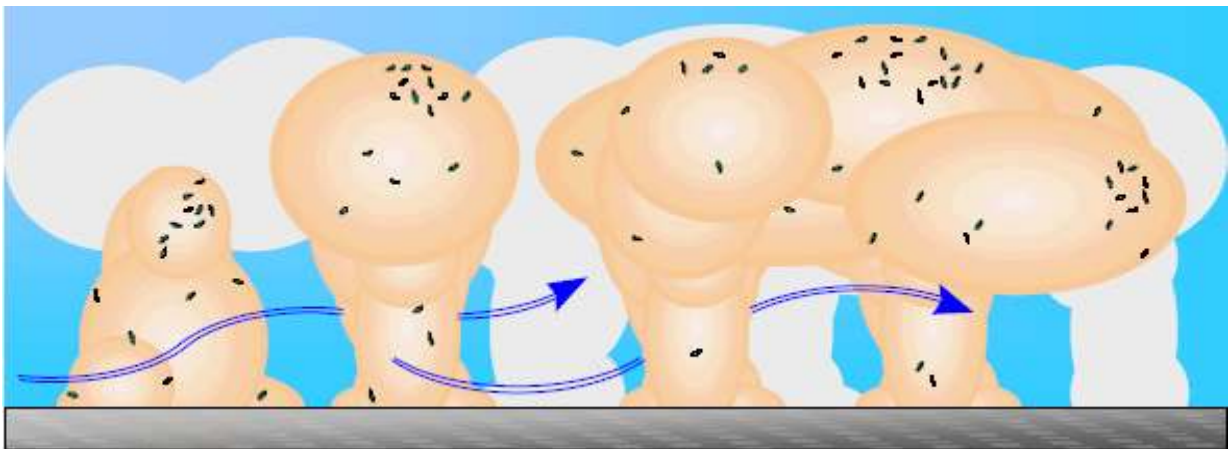


Abbildung 2.1: Modell eines aquatischen Biofilms. Darin sind Mikrokolonien in einer dichten EPS-Matrix eingebettet. Die Pfeile zeigen den konvektiven Stofftransport durch Poren bzw. Kanäle der EPS-Matrix (nach Costerton et al.^[13]).

Die Mikroorganismen machen in der Regel nur einen geringen Anteil der organischen Substanz im Biofilm aus. Es können unter anderem abiotische Partikel eingelagert sein, welche die Zusammensetzung des Biofilms beeinflussen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Mikrobiozönose aus Bakterien, Algen (bei Lichtzutritt), Pilzen und Protozoen besteht. Ebenfalls können darin Viren und Bakteriophagen vorkommen^[3]. Da die Mikroorganismen über einen recht langen Zeitraum in unmittelbarer Nähe zueinander angesiedelt sind, kann es unter anderem zu zahlreichen Wechselwirkungen kommen. Diese Wechselwirkungen können dazu führen, dass es zu synergetischen Gemeinschaften zwischen den verschiedenen Mikroorganismen in einem Biofilm kommt. Dieser Zusammenschluss in einem Biofilm schützt diese gegen äußere Einflüsse. So ist es möglich, dass das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge von Patienten, die an Mukoviszidose erkrankt sind, Biofilme bildet, womit sich das Bakterium gegen ein Antibiotikum schützt^[17]. Die Mikrokonsortien sind auch

in der Lage, komplexe Verbindungen abzubauen^[5]. Die Bakterien in Biofilmen kommunizieren mit Hilfe von Signalmolekülen, durch die sie benachbarte Zellen z.B. veranlassen, bestimmte Gene zu aktivieren. Darüber hinaus ist ein Gentransfer zwischen den Nachbarn möglich^[4]. Die membranpermeablen Signalmoleküle werden von den Mikroorganismen selbst produziert und durch Diffusion in die Umgebung freigesetzt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Biofilm eine Reihe von Vorteilen für das Leben von Mikroorganismen bietet. Durch die EPS-Matrix, die die jeweiligen Mikroorganismen umgibt, werden diese gegen Umwelteinflüsse geschützt. Außerdem können sie sich optimal den Bedingungen in der EPS-Matrix anpassen. Des Weiteren sind die Mikroorganismen durch die Gelmatrix mit ihrem hohen Wassergehalt gegen Austrocknung geschützt.

2.1.2 Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS) von Biofilmen

Die Abkürzung „EPS“ bezieht sich in dieser Arbeit auf „extrazelluläre polymere Substanzen“, sie wird auch für „extrazelluläre Polysaccharide“, „Exopolysaccharide“ und Exopolymere“ verwendet^[4]. Die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) werden definiert als charakteristische, biologische Makromoleküle (Biomoleküle) mikrobiellen Ursprungs, wobei deren Struktur, Zusammensetzung, biologische Aktivität und Funktion maßgeblich sind^[8].

In anderen Arbeiten wird die Abkürzung „EPS“ für „extrazelluläre polymere Substanzen biologischen Ursprungs, die an der Bildung mikrobieller Aggregate beteiligt sind“ verwendet^[18].

Die EPS halten die Mikroorganismen in Biofilmen, Flocken und Schlämmen zusammen (Kohäsion), verleihen ihnen ihre Form, sowie ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften. Unter Zuhilfenahme der EPS können die Mikroorganismen den Raum zwischen den Zellen formen und beeinflussen, außerdem stellen die EPS die Schlüsselmoleküle für die Struktur, Funktion und Organisationsform von Biofilmen dar^[19]. Die Zusammensetzung der EPS im Biofilm und deren quantitative Zusammensetzung sind Schwankungen unterworfen, die von den Umgebungsbedingungen abhängen. Die EPS können deshalb einen Anteil von 50%-90% der gesamten organischen Substanz annehmen^[5]. Die Bildung von EPS ist eine generelle Fähigkeit von Mikroorganismen und wurde in prokaryontischen Mikroorganismen (Bakterien und Archaeen) ebenso wie in eukaryontischen Mikroorganismen (Algen und Pilze) in ihrer natürlichen Umgebung nachgewiesen. Die Polysaccharide binden Wasser und bilden so die

EPS-Matrix, welche eine gewisse mechanische Festigkeit aufweist, in der die Organismen stabile Mikrokonsortien bilden können, welche zu sequenziellen Abbauprozessen befähigt sind. Nicht alle Bewohner des Biofilms tragen gleich viel EPS zur Schaffung der Matrix bei. In Mischkulturbiofilmen reicht es aus, wenn nur eine Art hinreichend EPS bildet, so dass andere Arten sich in ihr einnisten können. In dieser Matrix werden Nährstoffe und extrazelluläre Enzyme konzentriert, bewahrt und Wechselwirkungen zwischen verschiedenen EPS-Komponenten ermöglicht.

Einige der auftretenden Wechselwirkungen sind in der Abbildung 2.2 dargestellt.

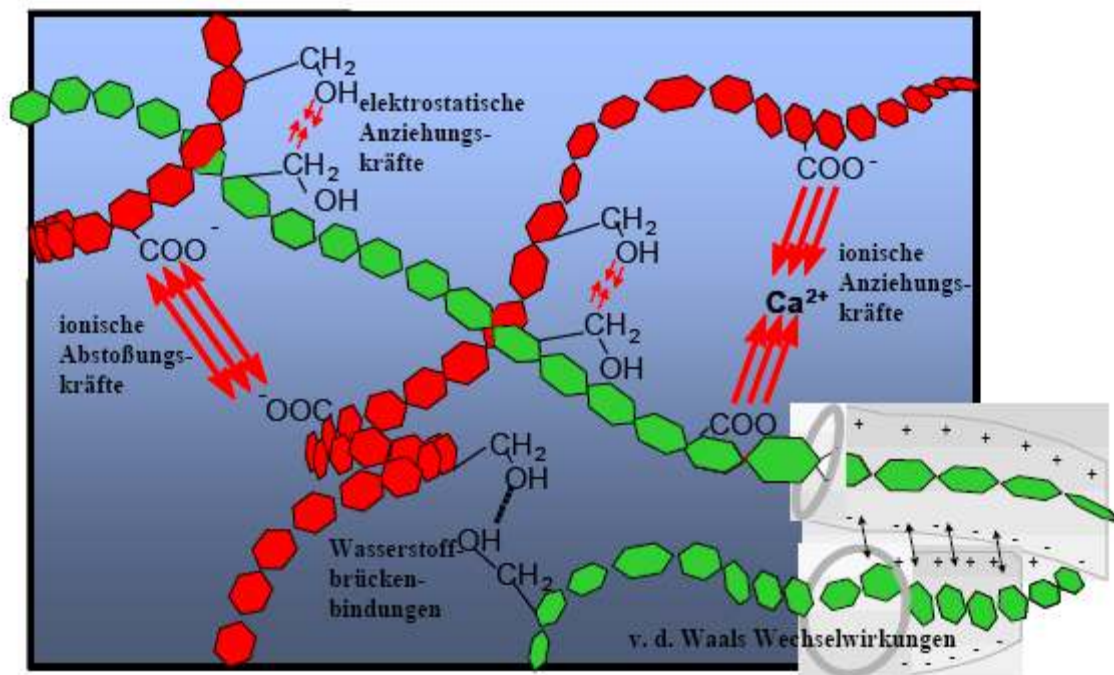


Abbildung 2.2: Darstellung der verschiedenen Wechselwirkungsarten der EPS-Matrix^[20].

Da fadenförmige Makromoleküle Verschlaufungen und Verknotungen bilden und diese untereinander schwach wechselwirken, bilden die EPS ein dreidimensionales Netzwerk. Die auftretenden Wechselwirkungen kommen meist durch van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff-Brücken-Bindungen und elektrostatische Wechselwirkungen zustande. Das EPS-Netzwerk wird deshalb von erheblichen Kräften zusammengehalten, denn die resultierende Kraft setzt sich aus allen Wechselwirkungstypen zusammen^[21]. Einen wesentlichen Einfluss auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Biofilms üben die geladenen Gruppen der Polysaccharide (z.B. Carboxylgruppen an Uronsäuren), wie auch die Substituenten (z.B. Acetylgruppen) aus. Zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Biofilms zählen die Bindungsfähigkeit, Festigkeit, Viskosität, Wasserbindungskapazität und die Selektivität mit der anorganische Ionen gebunden werden^[3].

Den größten Anteil der EPS machen in der Regel die Polysaccharide aus, es kommen aber auch Lipide, Proteine und Nukleinsäuren in einem beträchtlichen Anteil vor. Von allen beteiligten Polymeren stellen die Polysaccharide die am besten untersuchten Komponenten dar^[13, 22]. Bei Untersuchungen wurden Homopolysaccharide als Bestandteil der EPS gefunden, welche nur aus einem Monosaccharid-Baustein (z.B. Cellulose, Curdlan, Dextran und Levan) gebildet werden. Diese Bausteine bestehen aus neutralen Elementen (z.B. Fructose und Glucose), oder nur aus anionischen Bausteinen, welche aus Uronsäuren aufgebaut sind. Genauso sind Heteropolysaccharide bekannt, die entweder neutrale oder auch geladene Bausteine enthalten. Diese sind aus Wiederholungseinheiten von 2-8 Zuckern (z.B. Hyaluronat und Xanthan) zusammengesetzt. Das Rückgrat der linear oder auch verzweigt auftretenden Polysaccharide besteht meist aus 1,3- oder 1,4-glykosidisch verbundenen Monosaccharid-Bausteinen mit α - oder β -Konfigurationen der jeweiligen Zucker^[13].

Tabelle 2.1: Allgemeine Zusammensetzung bakterieller EPS^[21]

EPS	Komponenten (Untereinheiten, Vorstufen)	Hauptbindungstypen	Struktur des Polymerrückgrats	Substituenten (Beispiele)
Polysaccharide	Monosaccharide Uronsäuren	glycosidische Bindungen	lineare, verzweigte Seitenketten	organisch: O-Acetyl. N-Acetyl. Succinyl. Pyroviol. anorganisch : Sulfat. Phosphat
Proteine (Polypeptide)	Aminosäuren	Peptidbindungen	linear	Oligosaccharide (Glycoproteine) Fettsäuren (Lipoproteine)
Nukleinsäuren	Nukleotide	Phosphodiester- bindungen	linear	
Phospholipide	Fettsäuren Glycerin Phosphat Ethanolamin Serin Cholin Zucker	Esterbindungen	Seitenketten	
Huminstoffe	phenolische Verbindungen einfache Zucker Aminosäuren	Etherbindungen C-C Bindungen Peptidbindungen	Quervernetzungen	

2.2 Struktur und Eigenschaften von Polysacchariden

Polysaccharide sind zusammen mit den Proteinen die wichtigsten Bestandteile der EPS, weshalb sie maßgeblich die Eigenschaften der Biofilme bestimmen^[20]. Eine Betrachtung der speziellen Wesensmerkmale von Polysacchariden ist also unumgänglich und liefert eine Erklärungsbasis für das Verhalten von komplexen Biofilmsystemen.

Polysaccharide sind die Polymere der Monosaccharide^[23], also makroskopische Kohlenhydrate, die aus einer großen Anzahl verknüpfter Monosaccharid-Moleküle (mindestens 10, aber normalerweise deutlich mehr) bestehen^[24]. Sie haben die allgemeine Formel $-[C_x(H_2O)_y]_n-$. Sie werden wegen ihrer charakteristischen glykosidischen Bindungen zwischen den Zuckerresten auch Glycane genannt. Homopolysaccharide sind aus nur einem Monomertyp aufgebaut, Heteropolysaccharide bestehen aus zwei oder mehr. Man unterscheidet ferner lineare und verzweigte Moleküle. Im ersten Fall spricht man von Ketten- oder Fadenmolekülen^[25]. Die drei häufigsten natürlichen Polysaccharide (Cellulose, Stärke und Glycogen) leiten sich von demselben Monomer (Glucose) ab^[23]. Andere Polysaccharide bestehen überwiegend aus Pentosen oder Hexosen und deren Derivaten. Bei tierischen Polysacchariden kommen die stickstoffhaltigen Bausteine Glucosamin und Galaktoamin vor, ferner die Iduronsäure als Baustein des Heparins^[26]. Die häufigsten Zucker, welche zum Aufbau der Polysaccharide beitragen, sind in Abbildung 2.3 und in Abbildung 2.4 dargestellt.

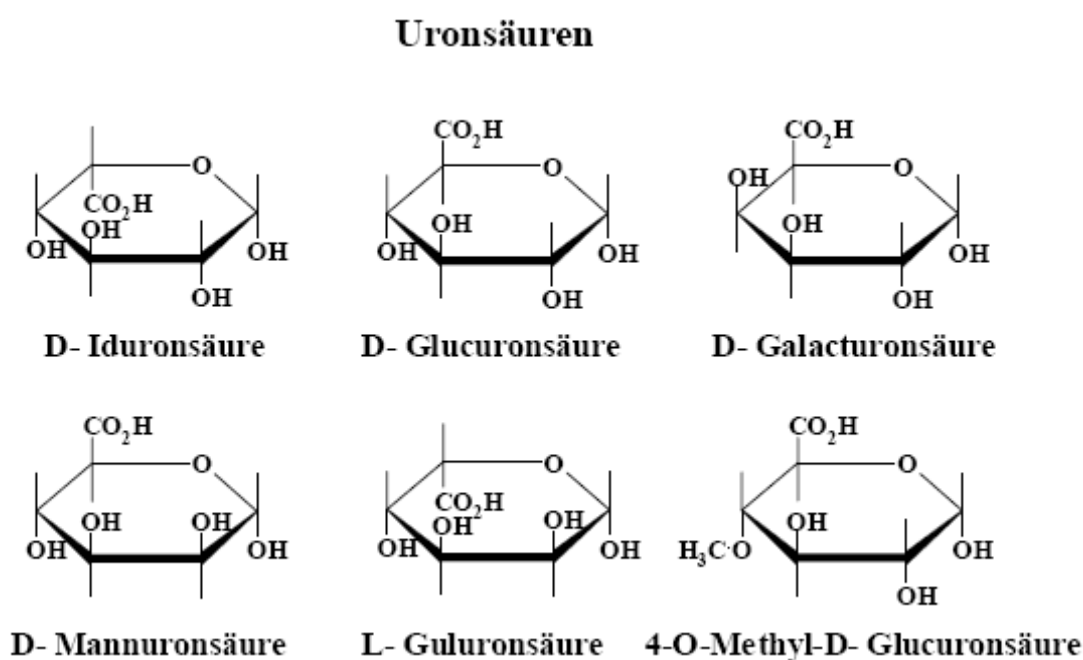


Abbildung 2.3: Häufige Monomerbausteine in Polysacchariden, Uronsäuren (Teil I)^[27].

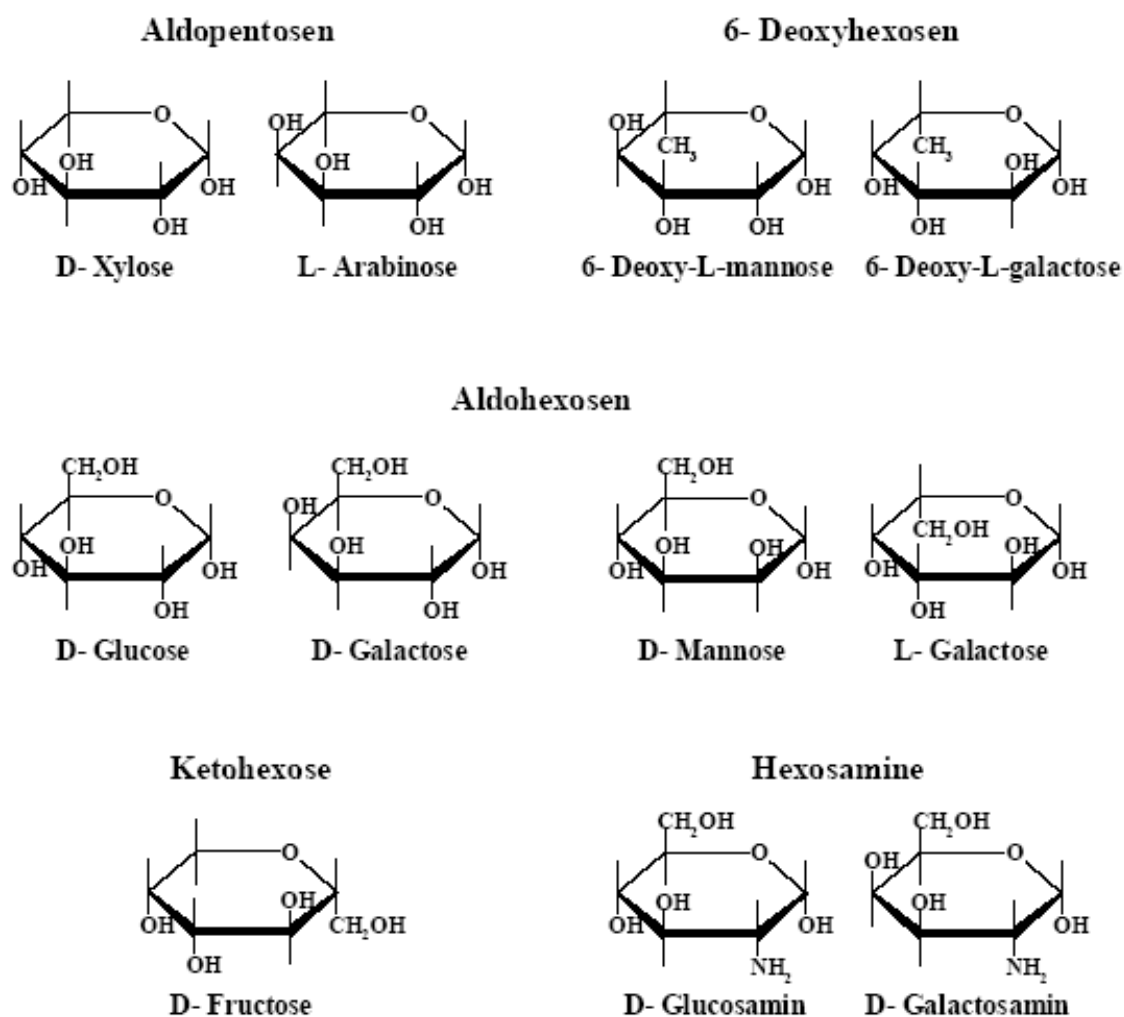


Abbildung 2.4: Häufige Monomerbausteine in Polysacchariden, Uronsäuren (Teil II)^[27]

Die Erscheinungsformen der Polysaccharide sind, trotz ihrer recht einfachen Grundstruktur, sehr vielseitig. Die Spanne der Molekulargewichte variiert von einigen Oligomeren bis zu Molekülen mit Molmassen von mehreren Millionen g/mol. Die Makromoleküle können linear (wie z.B. Cellulose, Chitin, Hyaluronsäure und Xanthan), verzweigt (wie z.B. Amylopektin, Dextran und Glykogen) oder als Netzwerkstrukturen vorliegen^[28]. Es wird ferner zwischen homopolymeren und heteropolymeren Polysacchariden unterschieden. Die letzteren treten als regelmäßige Copolymere auf und bestehen aus zwei bis acht unterschiedlichen Saccharidmonomeren^[27]. Die Polysaccharide sind fast immer polymolekular, was bedeutet, dass sie sich aus einer Vielzahl von Molekülen mit einer breiten Molmassenverteilung aber identischem Grundgerüst zusammensetzen. Damit weisen sie in vielen Fällen einen hohen Grad an Polydispersität auf^[29].

Im Vergleich zwischen Polysacchariden und Proteinen wird die enorme Vielfalt der glykosidischen Bindung deutlich. Wird dabei die Struktur eines simplen Dipeptids mit einer

Art von Aminosäure betrachtet, so resultiert nur eine einzelne Struktur, in der zwei Aminosäurereste durch eine Peptidbindung gebunden sind. Dagegen kann eine sehr große Auswahl an verschiedenen Disacchariden aus einem Monosaccharidtyp entstehen, da jede der fünf verschiedenen glykosidischen Bindungen (1-1 bis 1-6) gebildet werden kann. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome im glykosidischen Ring ist in der Abbildung 2.5 gezeigt.

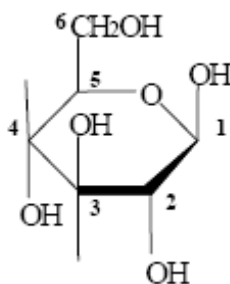


Abbildung 2.5: Darstellung der Nummerierung der sechs C-Atome in einem Monosaccharid (hierbei handelt es sich um eine Hexose).

Zusätzlich zu dem anomeren Kohlenstoffatom an der 1-Position kommt die α - oder β -Konformation, z.B. ist die Hydroxylgruppe an C-1 entweder oberhalb oder unterhalb der Ebene der D-Serie der Zuckerringstruktur angeordnet. Somit sind insgesamt 11 verschiedene Disaccharidstrukturen möglich. Mit Rücksicht auf eine korrekte Polysaccharidstruktur wird die 1-1 Bindung ausgelassen, dies ergibt für den Kettenschluss 8 mögliche Disaccharidstrukturen. Somit erhält man eine 8-mal größere Divergenz von Polysaccharidstrukturen im Vergleich zu Proteinen.

Zusätzlich zu dem anomeren Kohlenstoffatom an der 1-Position kommt die α - oder β -Konformation, z.B. ist die Hydroxylgruppe an dem C-1-Kohlenstoff entweder oberhalb oder unterhalb der Ebene der D-Serie der Zuckerringstruktur angeordnet. Somit sind insgesamt 11 verschiedene Disaccharidstrukturen möglich. Mit Rücksicht auf eine korrekte Polysaccharidstruktur wird die 1-1 Bindung ausgelassen, dies ergibt für den Kettenschluss acht mögliche Disaccharidstrukturen. Somit erhält man eine 8-mal größere Divergenz von Polysaccharidstrukturen im Vergleich zu Proteinen. Außerdem sorgen die 30 verschiedenen Monosaccharide, welche in Polysacchariden gefunden werden, für einen weiteren Anstieg der Divergenz. Denn im Gegensatz dazu werden bei den Proteinen nur 20 mögliche Aminosäuren gefunden. Des Weiteren können die Polysaccharide mit verschiedenen „nicht-Kohlehydrat“-Gruppen substituiert sein.

Die physikalischen Eigenschaften der Polysaccharide werden zum Teil durch die Natur der glykosidischen Bindung bestimmt. Die Bindungsnomenklatur erfolgt gemäß den beteiligten monomeren Zuckermolekülen. Bei Amylose und Cellulose liegt zum Beispiel eine 1,4-glykosidische Bindung, bei Dextran dagegen eine 1,6-glykosidische Bindung vor. Die 1,4-Konformation der glykosidischen Bindung kann man durch zwei Winkel Φ und Ψ beschreiben. Die 1,6-glykosidische Bindung dagegen ist komplexer, und es wird ein weiterer Winkel ω für die exakte Beschreibung der lokalen Struktur benötigt. Aus der graphischen Darstellung der Abbildung 2.6 ist leicht ersichtlich, dass die 1,6-glykosidische Bindung eine deutlich höhere Flexibilität aufweist als die 1,4-glykosidische Bindung. Dies liegt unter anderem an der Abwesenheit des zusätzlichen Torsionswinkels, aber auch an den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Ringsauerstoffatom und der Hydroxylgruppe am C-3-Atom (I), bzw. an den Hydroxylgruppen der C-2- und C-3-Kohlenstoffatome (II), die die Rotationsfreiheit stark beeinträchtigt.

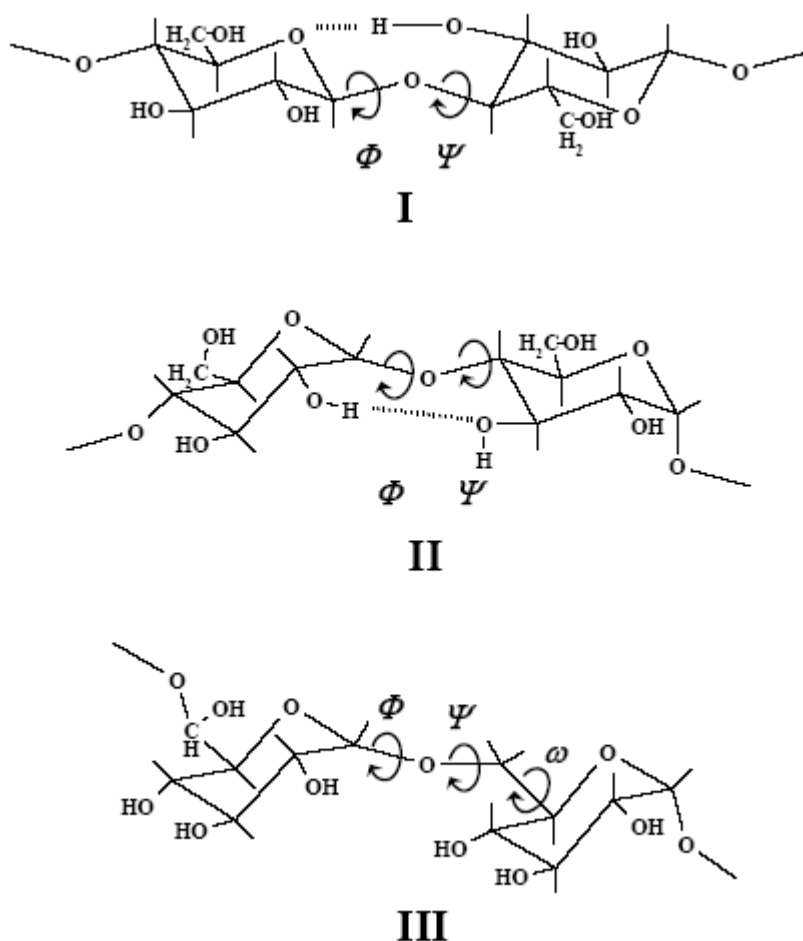


Abbildung 2.6: Darstellung der Beweglichkeit der glykosidischen Bindung an drei Beispielen: I) Cellulose, II) Amylose, III) Dextran; die gepunkteten Linien symbolisieren die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen^[30].

2.2.1 Polyelektrolyte

Allgemein sind Polyelektrolyte (PEL) Makromoleküle, die in ihrer Polymerhaupt- bzw. Seitenkette ionische oder ionisierbare Gruppen tragen (bei einigen PEL auch in beiden Ketten). Entsprechend der Art der ionischen Gruppen werden sie in Polyanionen (Abbildung 2.7), Polykationen (Abbildung 2.8) und Polyamphotere (diese tragen beide Arten geladener Gruppen entlang der Polymerkette) unterteilt.

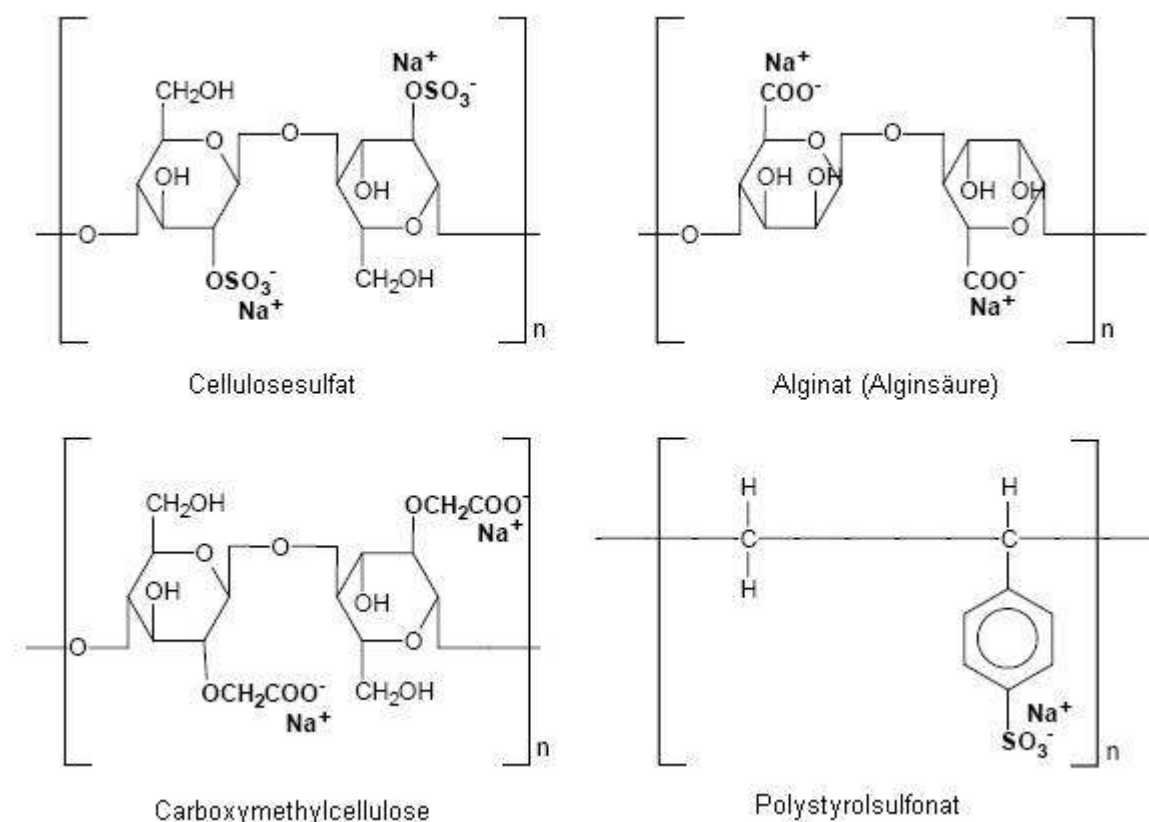


Abbildung 2.7: Ausgewählte Polyanionen^[31]

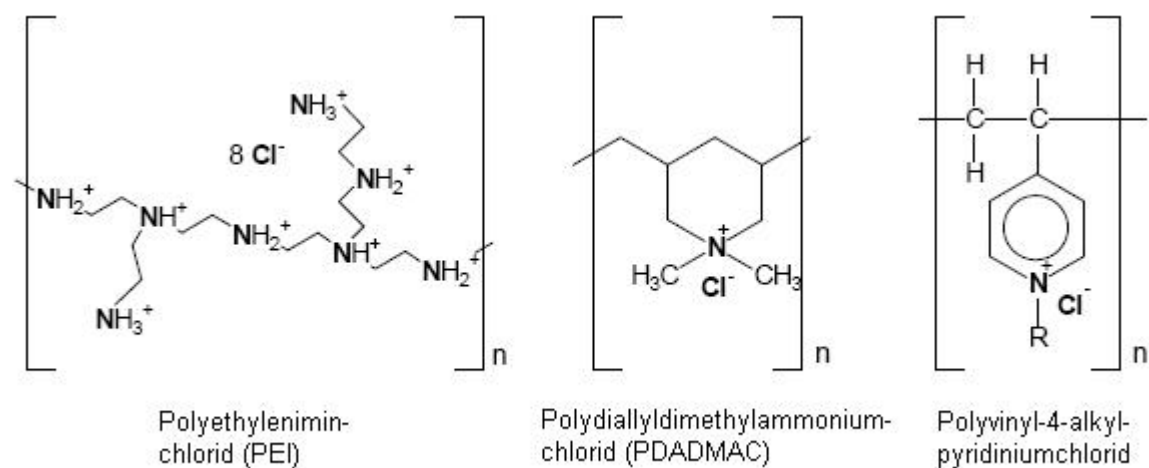


Abbildung 2.8: Ausgewählte Polykationen^[31-33]

Die Ladungen an den Polymerketten werden durch eine stöchiometrisch gleiche Anzahl von niedermolekularen Ionen entgegengesetzter Ladung (Gegenionen) kompensiert. Aufgrund dieser dissoziationsfähigen ionischen Gruppen sind Polyelektrolyte in der Regel wasserlöslich. In Lösung zeigen sie sowohl Eigenschaften von Makromolekülen als auch von Elektrolyten. Das daraus resultierende charakteristische Eigenschaftsbild der Polyelektrolyte wird sowohl durch die chemische Struktur der Polymerkette (verzweigt, unverzweigt), als auch durch Ladungsart und Lokalisierung der ionischen Gruppen und deren Wechselwirkungen miteinander und mit den entsprechenden Gegenionen bestimmt^[34].

Außer nach der Ladungsart ihrer ionischen Gruppen (elektrochemische Eigenschaften) können Polyelektrolyte auch nach weiteren Kriterien, wie Herkunft oder makromolekulare Struktur, unterteilt werden. Eine derartige Klassifizierung wird in Tabelle 2.2 gezeigt.

Tabelle 2.2: Klassifizierung von Polyelektrolyten

Kriterium	Unterteilung
Herkunft	natürliche Polyelektrolyte synthetische Polyelektrolyte chemisch modifizierte Biopolymere
Zusammensetzung	Homopolymere Copolymere
Molekularstruktur	lineare Polyelektrolyte verzweigte Polyelektrolyte vernetzte Polyelektrolyte
Elektrochemisch	Polysäuren, Polybasen Polykationen, Polyanionen Polyampholyte

Polysaccharide, Nukleinsäuren, Proteine und Lignine sind bedeutsame Substanzklassen von natürlichen Polyelektrolyten bzw. chemisch modifizierten Biopolymeren.

2.2.2 Alginate

Das Alginat ist ein sehr intensiv untersuchtes Polysaccharid, welches aus der Zellwand der Braunalge und von einigen Bakterien gebildet wird. Dabei handelt es sich um ein aus der Uronsäure aufgebautes Heteropolysaccharid. Der Name stammt daher, dass dieses Polymer 40% der Trockenmasse der Algen ausmacht^[35]. Die Algenalginat sind unverzweigte Copolymere, welche sich aus dem Monomerbaustein β -D-Mannuronat und dessen C5-Epimer α -L-Guluronat zusammensetzen. Obwohl sich diese beiden Uronsäuren nur geringfügig in ihrer Struktur unterscheiden, nehmen sie unterschiedliche Sesselkonformationen ein. Dadurch liegt die Carboxylgruppe in der energetisch günstigeren äquatorialen Orientierung.

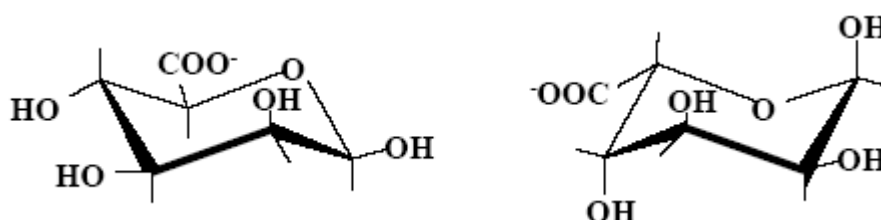


Abbildung 2.9: β -D- Mannuronat (M)

α -L- Guluronat (G)

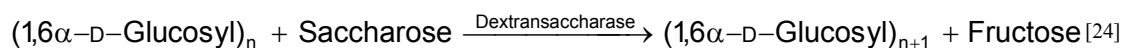
Aus der Abbildung 2.9 ist zu erkennen, dass die resultierenden glykosidischen Bindungen im Polysaccharid an den C1- und C4-Positionen für das β -D- Mannuronat äquatoriale und für das α -L- Guluronat axiale Orientierung besitzen. Die Monomere innerhalb eines Alginatmoleküls sind in einer Reihe von Blockstrukturen angeordnet. Dabei liegen homopolymere Blöcke [Poly- β -D-Mannuronat (M-Blöcke) und Poly- α -L-Guluronat (G-Blöcke)], aber auch alternierende Sequenzen (MG-Blöcke) nebeneinander vor^[36]. Bei den Algenalginaten folgt die Sequenzverteilung der strukturgebenden Monomereinheiten rein statistischen Gesetzmäßigkeiten. Die anteilige Zusammensetzung der Monomere (so genanntes M/G-Verhältnis) ist mitbestimmend für die physikalischen Eigenschaften. Aufgrund der Natur der glykosidischen Bindung weisen mannuronatreichere Bereiche der Alginate eine flexible Bänderstruktur auf, wohingegen guluronatreiche Bereiche starre Kettensegmente ausbilden. Für die verschiedenen Bakterienspezies sind normalerweise deren Bakterienalginat spezifisch^[37]. Diese Bakterienalginat weisen eine ähnliche Grundstruktur wie die Algenalginat auf, in einigen Merkmalen unterscheiden sie sich aber von diesen. Die Alginat vom *Azotobacter vinelandii* weisen bzgl. der Sequenz und der Häufigkeit bestimmter Blockstrukturen die größte Ähnlichkeit zu den Algenalginaten auf. Anders verhalten sich die

Alginate verschiedener *Pseudomonas* Spezies. Die isolierten Polyuronsäuren der Pseudomonaden besitzen im Gegensatz zu den Algenalginaten keine Polyguluronatblöcke. Dass die Sequenzverteilung im Polymer von verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen nicht statistischer Natur sind, zeigten ausführliche Strukturanalysen von Alginatisolaten der unterschiedlichen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme^[38, 39]. Des Weiteren verfügen Alginate bakterieller Herkunft über Acetylgruppen, welche ausschließlich an den O-2- oder O-3-Sauerstoffen der D-Mannuronatreste lokalisiert sind. Partiell ist es möglich, dass eine gleichzeitige Acetylierung an beiden Positionen auftreten kann. Dies konnte durch ¹H-NMR Messungen nachgewiesen werden^[39]. Eine Erhöhung der Hydrophobizität von Monomerbausteinen kommt durch die Acetylierung der Mannuronatreste zustande. Auf das gesamte Molekül übertragen verringern sich die Wechselwirkungen zwischen Polymeren und Wasser und die Polymer-Polymer Wechselwirkungen nehmen zu. Aus diesem Grund ist ein vermindertes Quellvermögen der acetylierten Alginate zu beobachten^[40]. Die gehemmte Tendenz zur Gelierung in Anwesenheit von bivalenten Kationen stellt eine weitere Konsequenz der Acetylierung dar^[41, 42]. Mitte der 60er Jahre wurde durch Linker und Jones erstmals die Existenz bakterieller Alginate an Hand von Pseudomonaden nachgewiesen^[43, 44].

In vielen Bereichen des täglichen Lebens finden Alginate eine Verwendung. So findet man sie z. B. in Körperpflegemitteln, wie Cremes oder Zahnpasta, aber auch in Lebensmitteln, wie beispielsweise in Mayonnaise, Salatdressing oder Speiseeis. Die Medizin stellt ein weiteres wichtiges Verwendungsgebiet dar. Dort werden Alginate im Körper als abbaubare Fäden verwendet^[20].

2.2.3 Dextran

Dextran ist ein schleimartiges, hochmolekulares, neutrales Biopolysaccharid auf der Basis von Glucose-Monomeren. Seine Molaremasse liegt zwischen $5 \cdot 10^3$ - $6 \cdot 10^6$ g/mol^[45]. Es ist ein gut wasserlösliches ungeladenes 1,6-Glucan, mit einigen Glucoseseitenketten, die hauptsächlich über 1,3-, aber auch teilweise durch 1,4- und 1,2-Bindungen, mit der Hauptkette verbunden sind. Es wird von den Bakterien der Gattungen *Leuconostoc mesenteroides* und *Leuconostoc dextranicum* mittels Enzymen extrazellulär innerhalb von 24 Stunden bei 25°C aus Saccharose nach der folgenden Gleichung gebildet.



Außerdem ist Dextran industriell über Fermentationsprozesse zugänglich.

Neben der 1,6- tritt auch die 1,3-Verknüpfung auf.

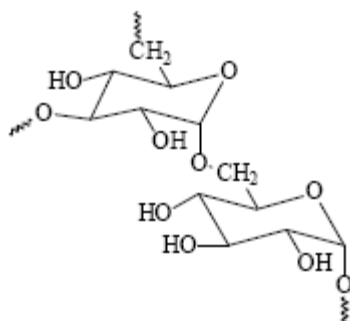


Abbildung 2.10: Dextran mit α -(1,6)-glykosidischer Hauptkette und einer α -(1,3)-glykosidischer Seitenkette.

Dextran wird als Blutplasmaersatzmittel eingesetzt, denn eine 6%-ige Dextranlösung hat die gleiche Viskosität und den gleichen kolloidosmotischen Druck wie Blutserum. Die Quellungseigenschaften und das Fehlen elektrischer Ladungen prädestinieren Dextran als Säulenmaterial für die Gel-Permeation-Chromatographie (GPC), bei der es in modifizierter Form zur Analyse wässriger Lösungen von großen Biomolekülen zum Einsatz kommt^[24]. Des Weiteren wird Dextran auch in Klebstoffen, Leimen, Filmen, Anstrichmitteln, Detergentien, Bodenverbesserungsmitteln, Papier- und Textilfinishes und Kosmetika eingesetzt. Im Lebensmittelbereich wird es als Verdickungsmittel und als Stabilisator in Backwaren und Süßwaren, sowie in Getränken und Speiseeis verwendet^[24, 46, 47].

2.2.3 Hyaluronsäure

Bei der Hyaluronsäure (HA) handelt es sich um ein Glycosaminoglykan (GAG). Sie setzt sich aus einer makromolekularen Kette aus Disacchariden zusammen, welche wiederum aus je zwei Glucosederivaten bestehen. Dabei handelt es sich um D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamid. (siehe Abbildung 2.11) Beide unterscheiden sich von der β -D-Glucose nur durch eine Substitution am C-6- bzw. am C-2-Kohlenstoffatom. Im Disaccharid werden die Glucuronsäure und das N-Acetylglucosamid glykosidisch β (1 \rightarrow 3) verknüpft. Die nächste Glucuronsäure in der polymeren Kette wird wiederum β (1 \rightarrow 4) mit diesem Disaccharid verknüpft. Solch eine Disaccharidkette besteht aus 2000 bis 3000 Disaccharideinheiten^[24].

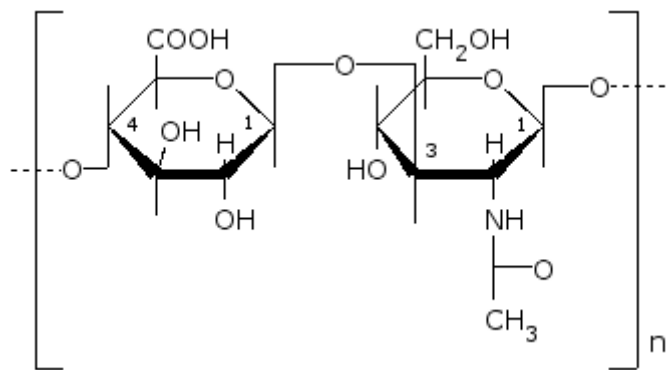


Abbildung 2.11: Hyaluronsäure bestehend aus $\beta(1\rightarrow3)$ D-Glucuronsäure (links) und $\beta(1\rightarrow4)$ N-Acetylglucosamid (rechts).

Mit den Carboxyl- und N-Acetylgruppen werden in wässriger Lösung Wasserstoffbrückenbindungen gebildet. Dies hat zur Folge, dass Zufallsknäuel mit einem Durchmesser von ca. 500 nm entstehen. Bei Konzentrationen unter 1 g/L findet eine spontane Entfaltung statt^[48].

Vergleicht man die Hyaluronsäure mit anderen Glycosaminoglykanen (GAGs), so nimmt sie eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu den anderen GAGs ist sie kein Proteoglykan und besitzt mit mehreren Millionen g/mol eine besondere Molekülgröße. Diese wirkt sich bei vielerlei Untersuchungsmethoden als störend aus. Außerdem fehlen gegenüber den GAGs die Sulfatreste und es konnte keine Kernregion nachgewiesen werden. Des Weiteren ist die Biosynthese nicht ausreichend geklärt, da fundierte Kenntnisse bezüglich der Initialschritte fehlen. In der Literatur wird ein Mechanismus der Biosynthese von Hyaluronsäure beschrieben, der einen alternierenden Einschub von UDPGlcNAc und UDPGlcNA vom reduzierenden Ende der wachsenden Kette beschreibt. Dieser Mechanismus ist eher typisch für die Bildung bakterieller Polysaccharide, wobei immer der letzte eingefügte UPD-Rest das Ende der Kette bildet^[49].

Die Hyaluronsäure wird nicht wie alle anderen Glycosaminoglykanen im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat zusammengesetzt, sondern von integralen Membranproteinen. Wirbeltiere besitzen drei Typen (HAS1, HAS2 und HAS3) dieser HA-Synthasen. Diese Enzyme hängen von der Innenseite der Zelle her immer neue Monosaccharidbausteine an die Kette an, die so immer länger wird und nach außen durch die Membran aus der Zelle herauswächst. Industriell wird Hyaluronsäure von Streptococcus-Bakterien hergestellt. Diese produzieren eine Hülle aus EPS um die Zelle, die zu großen Teilen aus Hyaluronsäure besteht. Mit Hilfe dieser Hülle ist es für die Bakterien einfacher in fremde Organismen einzudringen^[50].

Die Hyaluronsäure ist in der Lage, eine relativ große Menge an Wasser in Bezug auf ihre Masse zu binden (bis zu sechs Liter pro Gramm HA). So besteht zum Beispiel der Glaskörper des Auges zu 98% aus Wasser, das an nur 2% Hyaluronsäure gebunden ist.

Wasser ist sehr wenig komprimierbar, eine Eigenschaft die es an hyaluronsäurehaltiges Gewebe weitergibt. Allgemein gilt dies für große Teile des Bindegewebes. Diese Tatsache hat während der Embryonalentwicklung, wenn noch keine festen Strukturen entwickelt sind, eine spezielle Bedeutung.

Die Hyaluronsäure ist in der Natur ubiquitär verbreitet, so findet man sie nicht nur bei Einzellern als EPS, sondern auch bei höheren Organismen wie den Wirbeltieren. Dort ist sie der Hauptbestandteil der Synovia (Gelenkflüssigkeit) und wirkt als Schmiermittel bei allen Bewegungen der Gelenke. In den Gelenken zeichnet sie sich besonders durch ihre thixotropen Eigenschaften aus. Dies bewirkt, dass sich ihre Viskosität mit dem Einwirken von mechanischen Kräften verändert. Je größer die Scherkräfte werden, um so mehr nimmt die Viskosität ab^[51]. Die Hyaluronsäure ist dann zwar flüssig, aber durch ihre hochmolekulare Gestalt viskos genug, dass sie nicht wie Wasser aus den Gelenken gedrückt wird^[50].

Wirken am Anfang einer Bewegung nun zum Beispiel starke Druckkräfte auf ein Gelenk, knäueln sich die Moleküle zu Kugeln zusammen und ordnen sich wie in einem Kugellager an der Knorpeloberfläche an. Tritt eine schnelle Scherbewegung auf, wie z.B. beim Laufen, so wird die Zähigkeit der Hyaluronsäure wegen ihrer Thixotropie sofort herabgesetzt, womit sich gleichzeitig die Reibung verringert. Dieses Phänomen machen sich auch die Mikroorganismen in einem Biofilm zunutze und erhöhen so die Stabilität des Biofilms deutlich^[50].

Die Hyaluronsäure erweitert die Zellzwischenräume, wodurch die Migration (Wanderung) der Zellen unterstützt wird. So hält die Hyaluronsäure sozusagen die „Verkehrswege“ frei. Diese Eigenschaft ist ebenfalls für die Biofilme interessant, denn damit kann eine Diffusion von Nährstoffen im Biofilm gewährleistet werden.

In der Medizin werden Hyaluronsäurepräparate seit einigen Jahren in kranke Gelenke gespritzt, wobei die Wirksamkeit sehr unterschiedlich ist. Das Ziel einer solchen Behandlung ist die Funktion des erkrankten Gelenks zu verbessern. Die Erfolge bei dieser Art der Therapie sind sehr verschieden. Die anfänglich beobachteten allergischen Reaktionen wurden davon hervorgerufen, dass die Hyaluronsäure-Produkte aus Hahnenkämmen hergestellt wurden und deshalb Spuren von Hühnerproteinen enthielten. Seit die Hyaluronsäure-Produkte über Fermentationsprozesse mit Streptococcken hergestellt werden, sind allergische Reaktionen sehr selten geworden^[52]. Des Weiteren werden Hyaluronsäurepräparate auch zur

Faltenunterspritzung oder zum Aufspritzen der Lippen verwendet^[24, 50]. Außerdem wird Hyaluronsäure in Gesichtcremes zur Faltenglättung verwendet.

2.2.4 Xanthan

Das Xanthan stellt ein von *Xanthomonas campestris*, *Xanthan juglandis*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Azobacter vinelandii* unter aeroben Bedingungen gebildetes verzweigtes anionisches Heteropolysaccharid dar. Dessen Hauptkette besteht aus β -1,4-glykosidisch verknüpften Glucose-Molekülen und ist mit der Cellulose identisch. Ketalartig ist Brenztraubensäure an eine Seitenkette jedes zweiten Glucosemoleküls gebunden^[53]. Die Seitenketten bestehen dabei aus β -D-Mannose, aus (1,4)- β -D-Glucuronsäure und aus (1,2)- α -D-Mannose. Ähnlich wie Cellulose ist auch Xanthan über den ganzen pH-Bereich stabil. Bei hohen Temperaturen wird das Xanthan von starken Oxidationsmitteln wie z.B. Hypochlorit oder Persulfat abgebaut. Man geht davon aus, dass die Konformation des natürlichen Xanthans in rechtsgängigen Einzel- und Doppelhelices mit einer Windungshöhe von 47 nm vorliegt. Das Molekulargewicht von Xanthan liegt bei 10^6 – 10^7 Dalton^[53-55].

Industriell wird Xanthan im Chargen-Verfahren durch submerse Gärung unter starker Belüftung hergestellt. Außerdem kann es mit der zweitägigen Batch-Fermentation gewonnen werden. Dabei liegt die Ausbeute bei 25–30 g/L. Die gesamte Weltproduktion liegt bei 10.000 t pro Jahr^[24, 56].

Strukturviskose Xanthanlösungen werden als Verdickungsmittel und Stabilisatoren für Emulsionen in Nahrungsmitteln (wie z. B. Marmeladen, Mayonnaisen, Saucen, Speiseeis), Kosmetika, Farben und in der Erdölindustrie als Hilfsmittel beim Bohren eingesetzt^[24, 53, 57].

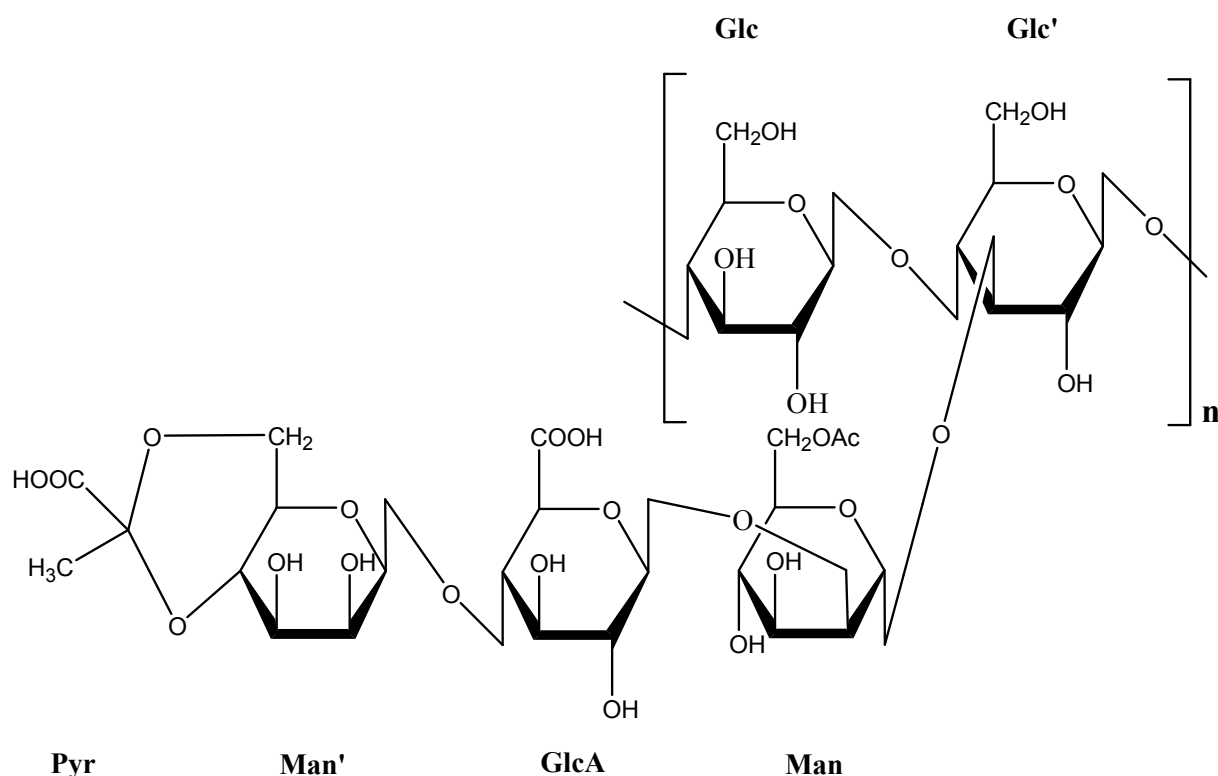


Abbildung 2.12: Grundeinheit von Xanthan

2.2.5 Wechselwirkungen zwischen bivalenter Kationen und Alginat: Das „Egg-Box“-Modell

Alginat verfügen über ein sehr gutes Bindungsvermögen gegenüber Kationen und sind in Gegenwart von bivalenten Kationen in der Lage, feste Gele zu bilden. Die Eigenschaften der Alginatgele werden dabei besonders von ihrer Molmasse, ihrer Konzentration und dem M/G-Anteil innerhalb der Polysaccharidketten gekennzeichnet. Guluronatreiche Alginat bilden feste aber brüchige Gele, dagegen bilden mannuronatreiche Alginat Gele mit geringerer Stärke, welche aber wesentlich flexibler sind^[29].

Anhand von CD-spektroskopischen Untersuchungen zur Wechselwirkung von Alginaten mit Ca^{2+} -Ionen haben *Grant et al.*^[9] gezeigt, dass eine chelat-ähnliche Bindung in den Alginatgelen vorliegt. Diese Bindung erfolgt fast ausschließlich über die Guluronatblöcke des Alginats. Aufgrund der axialen-axialen Anordnung der glykosidischen Bindungen im Polyguluronat besitzt die helicale Kettenstruktur eine sehr günstige Zweifachsymmetrie. Die so genannte „Egg-Box“ wird von dieser gefalteten Kettenstruktur gebildet, in welcher bivalente Kationen gebunden sind. Solch eine Konformation (siehe Abbildung 2.13) bewirkt, dass Wechselwirkungen zwischen dem Kation, dem Carboxylat-Sauerstoff und dem O-5 eines

Monomers sowie dem glykosidischen Sauerstoff, dem O-2 und dem O-3 von dessen Nachbarn auftreten. Dadurch ist für jedes Calciumion eine fünffache, chelat-ähnliche Koordination durch die Sauerstoffatome des Polyguluronatblocks möglich, wodurch eine stabile Komplexierung des Kations entsteht^[29].

Bei der Gelbildung handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess. Zunächst liegen die Polymerketten in wässrigen Lösungen als ungeordnete Knäuele nebeneinander vor. Erfolgt eine Dotierung der Lösung mit Ca^{2+} -Ionen, so bilden sich zunächst „Egg-Box“-Dimere. Dies geschieht indem die Ca^{2+} -Ionen zwischen zwei Guluronatblöcken eingelagert werden. Nimmt nun mit der Zeit die Ca^{2+} -Dotierung zu, so werden zunächst die Außenseiten der Dimere mit Kationen abgesättigt. Dies führt zur so genannten „half Egg-Box“-Bindung^[58]. Erst in dem darauf folgenden Schritt erfolgt die Bindung weiterer Polyguluronatblöcke an die bereits vorhandenen Dimere zu mehrschichtigen Netzwerkpunkten.

Die kooperative Bindung innerhalb der Calciumalginatgele weist eine hohe Stabilität auf. Experimente haben gezeigt, dass kaum noch ein Austausch mit anderen monovalenten Kationen stattfindet, sobald die für die Dimerbildung notwendige Äquivalenzkonzentration zwischen Calciumionen und Guluronatblöcken erreicht ist.

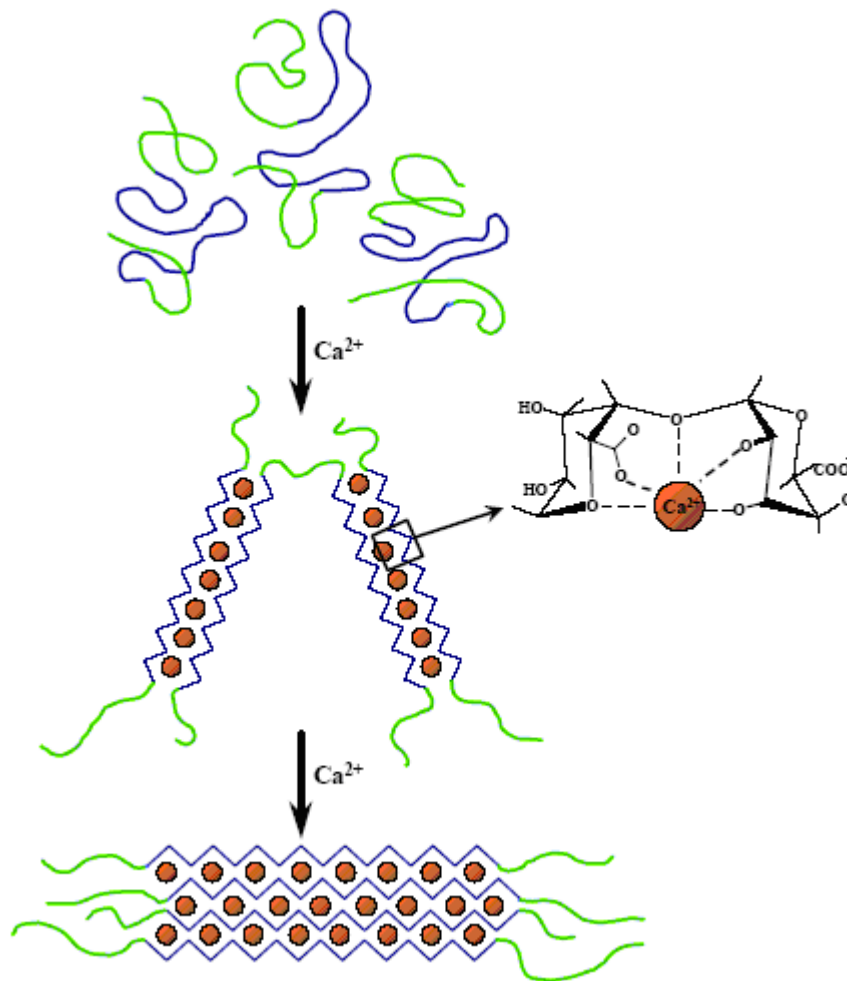


Abbildung 2.13: Das „Egg-Box“-Modell für Calcium-Alginatgele nach Yalpani^[59]; grüne Kettensegmente: Polymannuronatblöcke; dunkelblaue Kettensegmente: Polyguluronatblöcke; rechts: Detailansicht der Koordination eines Calciumions innerhalb einer „Egg-Box“^[29].

2.3 Schwermetalle

Als Schwermetalle wird willkürlich eine Gruppe von Metallen zusammengefasst. Durch das Fehlen einer eindeutigen wissenschaftlich akzeptierten Definition für den Terminus „Schwermetall“^[60], gibt es in der Literatur eine Vielzahl unterschiedlicher Definitionen. Eine Studie der IUPAC fand mindestens 38 Definitionen für diesen Begriff, der angefangen bei der Dichte, dem Atomgewicht oder der Ordnungszahl bis zu den chemischen Eigenschaften oder der Toxizität reicht^[61]. Aus diesem Grund unterscheiden sich Listen von Schwermetallen von einem Satz der Richtlinien zum anderen. Deshalb kommt es oft dazu, dass Halbmetalle wie z.B. Arsen mit eingeschlossen werden^[62]. Häufig wird der Begriff ohne Angabe der Metalle verwendet, auf die er sich im jeweiligen Kontext bezieht. Oft gelten alle mit dem Begriff Schwermetall bezeichneten Stoffe als toxische Substanzen^[62]. Diese Abgrenzung des Begriffs stellt sich als besonders problematisch dar, da viele so bezeichnete Elemente (z.B. Chrom, Cobalt, Eisen, Kupfer, Mangan und Nickel) für den Menschen essentiell wichtig sind. Aus den oben dargelegten Gründen ist die Bezeichnung aller anderen Metalle als Leichtmetalle ebenso undefiniert^[63]. In der Technik fallen unter den Begriff Schwermetalle sogar Legierungen mit hoher Dichte. Im Rahmen dieser Arbeit, wird der Begriff Schwermetalle an Hand der Dichte definiert. Demnach zählen alle Metalle mit einer Dichte über $4,5 \text{ g/cm}^3$ zu den Schwermetallen.

Durch den Eintrag von Schwermetallen in Gewässer kommt es zu Beeinträchtigungen aquatischer Lebensgemeinschaften. Dabei kommt es besonders zu Anreicherungen von toxischen Metallen in Biofilmen, welche als Oberflächen-, Sedimentfilme oder in Schwebstoffen vorliegen. Dieser Umstand führt zu zahlreichen Problemen. Dadurch, dass Mikroorganismen kontaminiertes Material aufnehmen, gelangen diese Schwermetalle in die Nahrungskette^[64]. Durch gezielte Maßnahmen ist es möglich eine Abnahme der Schwermetallemission zu erwirken^[65]. Im Zeitraum von 1985 bis 2000 konnte durch eine Verschärfung der Umweltschutzaufgaben für deutsche Unternehmen ein starker Rückgang der Schwermetallemissionen erreicht werden. So konnten die Reduktionsvorgaben durch das Internationale Meeresschutzabkommen für alle Metalle, bis auf Arsen und Nickel, erreicht werden.

Der Rückgang der Schwermetallemissionen in deutschen Flussgebieten ist in Abbildung 2.14 dargestellt.

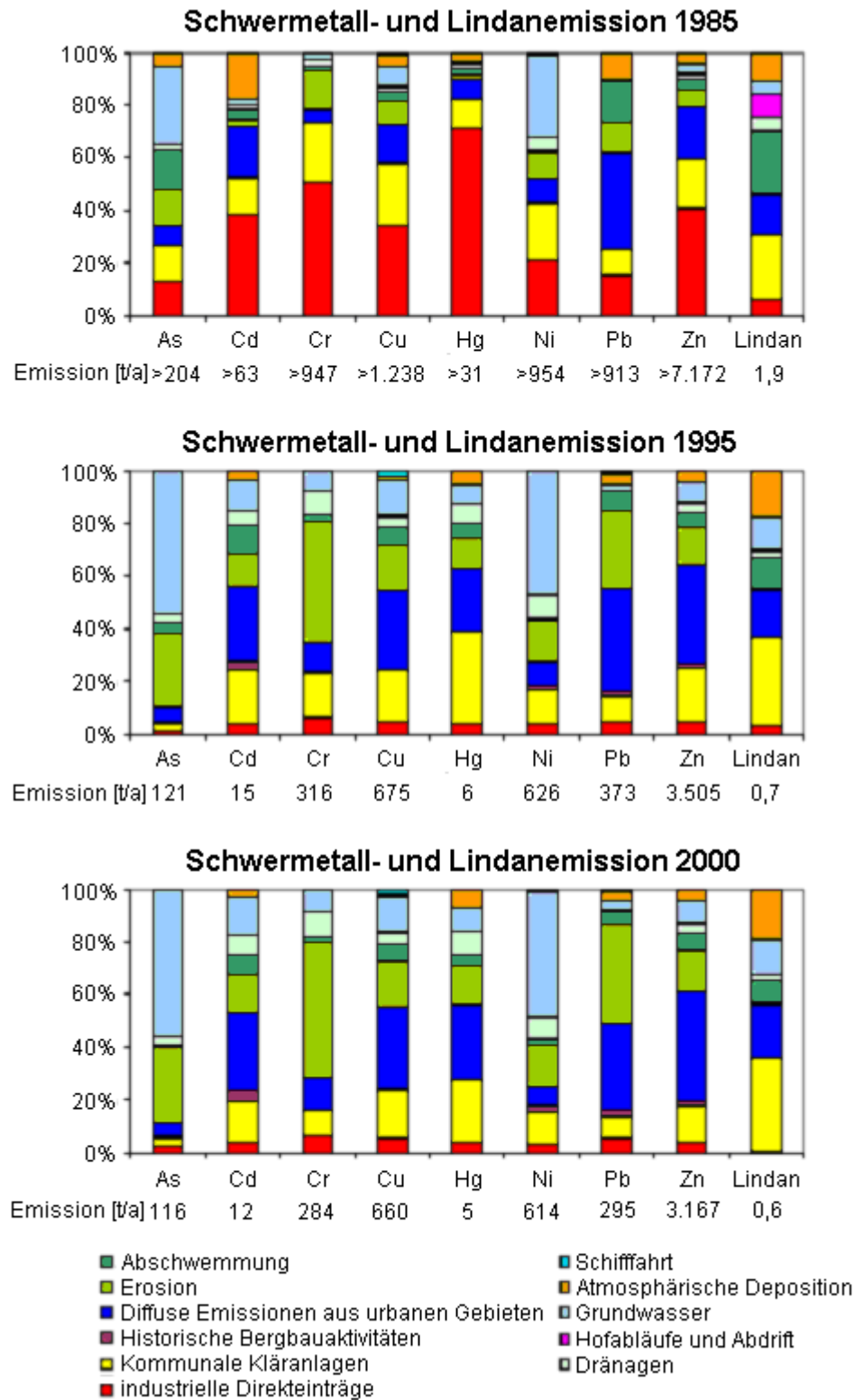


Abbildung 2.14: Schwermetallemissionen aus Punkt- und diffusen Quellen in den Flussgebieten Deutschlands in t/a^[66].

2.4 Verwendete Methoden zur Charakterisierung der Polysaccharide

2.4.1 Konduktometrie

Um die Bewegung von Ionen in einer Lösung zu bestimmen, kann der elektrische Widerstand dieser Lösung ermittelt werden. Meist wird dazu eine Leitfähigkeitszelle (Abbildung 2.10) in eine Wheatstone-Brücke eingebaut. Dabei ist aber darauf zu achten, dass eine Wechselspannung angelegt wird, da eine Gleichspannung eine Elektrolyse der Lösung und eine Polarisation der Elektroden hervorrufen würde. Darunter versteht man die Veränderung der Zusammensetzung der Grenzschichten, in der die Lösung und die Elektrodenoberfläche in direktem Kontakt stehen. Die Polarisation kann dadurch vermieden werden, dass eine Wechselspannung mit einer Frequenz von etwa 1 kHz angelegt wird. Dabei wird eine auftretende Polarisation sofort wieder rückgängig gemacht, sofern die Rückreaktion möglich ist.

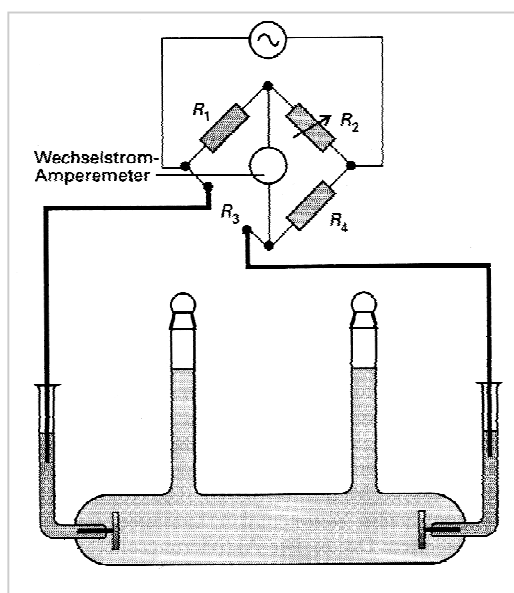


Abbildung 2.15: Wheatstone-Brücke mit eingebauter Leitfähigkeitsmesszelle^[67].

Unter der Leitfähigkeit einer Lösung versteht man den Kehrwert des elektrischen Widerstands R der Lösung. Je kleiner der Widerstand einer Lösung nun ist, umso größer ist die Leitfähigkeit der Lösung. Die Einheit des Widerstandes ist Ohm (Ω), also besitzt die Leitfähigkeit die Einheit Ω^{-1} , welche mit Siemens bezeichnet wird [$1\text{S} = 1/\Omega$].

Mit steigender Länge l nimmt der Widerstand der Probe zu, und bei steigendem Querschnitt A der Widerstand ab. Deshalb gilt:

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad (2-1)$$

ρ stellt den spezifischen Widerstand der Substanz dar. Der Kehrwert des spezifischen Widerstandes wird entsprechend spezifische Leitfähigkeit κ der Substanz genannt:

$$R = \frac{1}{\kappa} \frac{l}{A} \quad \text{oder} \quad \kappa = \frac{l}{RA} \quad (2-2)$$

Da der Widerstand in Ohm und die Länge in Meter ausgedrückt werden, erhält man für die spezifische Leitfähigkeit die Dimension Siemens pro Meter (Sm^{-1}), wobei auch sehr oft Scm^{-1} verwendet wird.

Es ist aber nicht ohne weiteres möglich, die spezifische Leitfähigkeit direkt aus dem Widerstand der Probe und den Abmessungen der Zelle (l und A) zu berechnen, denn innerhalb der Probe liegt eine komplizierte Stromverteilung vor. Aus diesem Grund wird die verwendete Messzelle mit einer Lösung mit bekannter spezifischer Leitfähigkeit κ^* kalibriert, womit man dann die Zellkonstante C berechnen kann.

$$\kappa^* = \frac{C}{R^*} \quad (2-3)$$

Dabei handelt es sich bei R^* um den gemessenen Widerstand des Standards. Besitzt nun die Probe in derselben Zelle einen Widerstand R , so beträgt ihre spezifische Leitfähigkeit

$$\kappa = \frac{C}{R} \quad (2-4)$$

Die Leitfähigkeit hängt ebenfalls von der Anzahl der in Lösung befindlichen Ionen ab. Aus diesem Grund führt man die so genannte molare Leitfähigkeit Λ_m ein, die als

$$\Lambda_m = \frac{\kappa}{c} \quad (2-5)$$

definiert ist, wobei es sich bei c um die molare Konzentration des Elektrolyten handelt. Die molare Leitfähigkeit wird in $\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$ angegeben. Damit diese unabhängig von der Konzentration ist, muss κ proportional zur Konzentration sein.

Des Weiteren kann man berücksichtigen, dass mehrfach geladene Ionen auf ihrer Wanderung mehr Ladung transportieren, als einfach geladene Ionen. Dazu definiert man die Äquivalentleitfähigkeit, in dem man die spezifische Leitfähigkeit durch die Äquivalentkonzentration dividiert^[24, 67].

Auf Grund der Leitfähigkeit unterscheidet man zwei Klassen von Elektrolyten, die starken Elektrolyte und schwachen Elektrolyte. Bei starken Elektrolyten nimmt die molare Leitfähigkeit nur leicht ab, wenn die Konzentration erhöht wird. Für einen schwachen Elektrolyten ist die Abhängigkeit viel stärker: die molare Leitfähigkeit nimmt schon bei kleinen Konzentrationen sehr stark ab und geht bei mittleren Konzentrationen bis auf sehr

kleine Werte zurück. Die Klassifikation hängt dabei ebenso von dem Elektrolyten wie von dem verwendeten Lösungsmittel ab.

Zu der Klasse der starken Elektrolyte zählen die Salze starker Säuren mit starken Basen, sowie starke Säuren wie HCl, HNO₃ und H₂SO₄. Da diese in Lösung vollständig dissoziiert sind, ist bei ihnen die Zahl der Ionen in der Lösung proportional zur Konzentration des zugesetzten Elektrolyten^[67-69].

Durch ausführliche Messungen zeigte F. Kohlrausch, dass die molare Leitfähigkeit von starken Elektrolyten bei kleinen Konzentrationen von der Wurzel der Konzentration des Elektrolyten abhängt:

$$\Lambda_m = \Lambda_m^0 - \kappa \sqrt{c} . \quad (2-6)$$

Diese Gleichung nennt man das Kohlrausch'sche Quadratwurzelgesetz. Die Konstante Λ_m^0 ist die molare Grenzleitfähigkeit, welche die molare Leitfähigkeit der Substanz bei unendlicher Verdünnung darstellt. Der Koeffizient κ hängt mehr von der Stöchiometrie des Elektrolyten ab, als von seiner genauen Identität.

Kohlrausch hat auch gezeigt, dass Λ_m^0 als Summe von Beiträgen der einzelnen Ionen geschrieben werden kann. Wenn man die molare Grenzleitfähigkeit des Kations mit λ_+ und des Anions mit λ_- bezeichnet, so besagt das Gesetz der unabhängigen Ionenwanderung:

$$\Lambda_m^0 = \nu_+ \lambda_+ + \nu_- \lambda_- . \quad (2-7)$$

Hierbei bezeichnet man ν_+ und ν_- als die Zahl der Kationen bzw. Anionen pro Formeleinheit des Elektrolyten.

Zu der Gruppe der schwachen Elektrolyte zählen Substanzen, die in Lösung nicht vollständig dissoziiert sind. Dazu gehören schwache Brönsted-Säuren und -Basen und deren Salze. Durch die Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichts kommt eine dramatische Abhängigkeit der molaren Leitfähigkeit von der Konzentration zustande:



Die Leitfähigkeit hängt von der Zahl der Ionen in der Lösung ab und daher vom Dissoziationsgrad α des Elektrolyten. Der Dissoziationsgrad ist so definiert, dass im Gleichgewicht für eine Konzentration c der Säure HA gilt:

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \alpha c, [\text{A}^-] = \alpha c \text{ und } [\text{HA}] = (1-\alpha)c . \quad (2-9)$$

Werden Abweichungen der Aktivitätskoeffizienten von eins vernachlässigt, so gilt für die Säurekonstante K_s

$$K_s = \frac{\alpha^2 c}{1 - \alpha} \quad (2-10)$$

Weil die Säurekonstante nur von der Temperatur und nicht von der Konzentration abhängt, kann man aus diesem Ausdruck auch den Dissoziationsgrad bei einer gegebenen Konzentration c berechnen:

$$\alpha = \frac{K_s}{2c} \left\{ \left(1 + \frac{4c}{K_s} \right)^{1/2} - 1 \right\} \quad (2-11)$$

Bezeichnet man die molare Leitfähigkeit eines hypothetischen, vollständig dissoziierten Elektrolyten mit Λ'_m , dann beträgt die tatsächliche molare Leitfähigkeit, wenn ein Teil α der Moleküle in Ionen dissoziiert,

$$\Lambda_m = \alpha \Lambda'_m, \quad (2-12)$$

wobei α durch die Gleichung (2-11) gegeben ist. Für sehr kleine Konzentrationen kann man Λ'_m auch durch die Grenzleitfähigkeit Λ_m^0 ersetzen und schreiben

$$\Lambda_m = \alpha \Lambda_m^0. \quad (2-13)$$

Wenn man K_s kennt, kann man die Konzentrationsabhängigkeit der molaren Leitfähigkeit vorhersagen.

Man kann auch die Konzentrationsabhängigkeit von Λ_m verwenden, um die molare Grenzleitfähigkeit eines Elektrolyten zu bestimmen. Durch Umformung der Gleichung für K erhält man

$$\frac{1}{\alpha} = 1 + \frac{\alpha c}{K} \quad (2-14)$$

Mit Gleichung (2-11) erhält man daraus das Ostwaldsche Verdünnungsgesetz:

$$\frac{1}{\Lambda_m} = \frac{1}{\Lambda_m^0} + \frac{\Lambda_m c}{K_s (\Lambda_m^0)^2} \quad (2-15)$$

Mit dieser Gleichung kann man die Grenzleitfähigkeit eines Elektrolyten bestimmen, indem man $\frac{1}{\Lambda_m}$ gegen c aufträgt. Man erhält dabei eine Gerade mit den Achsenabschnitt $\frac{1}{\Lambda_m^0}$ bei $c = 0$ ^[24, 67-69].

2.4.2 Viskosimetrie

Die Viskosität ist eine sehr wichtige technische und physikalische Eigenschaft, worin sich Polymere bzw. Polymerlösungen gegenüber anderen Materialien auszeichnen. Da die Viskosität unmittelbar mit der Größe der Moleküle korreliert ist, eignet sie sich auch als analytisches Instrument, um Informationen über die Moleküldimensionen und ihre räumliche Struktur zu erhalten.

Die Viskosität η ist der spezifische, innere Fließwiderstand, der in einer strömenden Flüssigkeit überwunden werden muss.

Durch das „Zwei-Platten-Modell“ wird das laminare Fließen von Flüssigkeiten am besten beschrieben. Zwischen einer bewegten und einer festen Fläche (Platte) befindet sich eine Flüssigkeitsschicht. Die sich an der bewegten Fläche befindliche Flüssigkeitsschicht nimmt die Geschwindigkeit der bewegten Fläche an, während die Geschwindigkeit der Grenzschicht an der ruhenden Fläche gleich Null ist. Zwischen diesen Extremwerten stellt man sich die Flüssigkeit als Schichtmodell vor, in dem sich ein Geschwindigkeitsgefälle zwischen den einzelnen Schichten einstellt.

In der Lösung verschieben sich beim Fließen die Flüssigkeitsschichten gegeneinander, wie es in Abbildung 2.16: Scherdeformation in einer fließenden Flüssigkeit dargestellt ist.

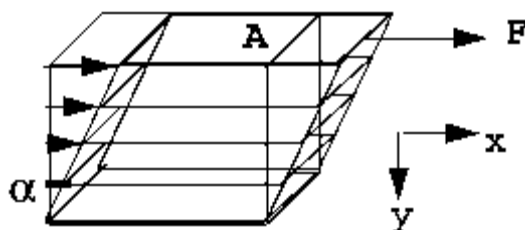


Abbildung 2.16: Scherdeformation in einer fließenden Flüssigkeit.

Die Viskosität, welche eine Stoffkonstante darstellt, wird durch die Schubkraft definiert, welche notwendig ist, um ein Volumenelement mit einer bestimmten Geschwindigkeit zu deformieren:

$$\tau = \frac{\text{Schubkraft}}{\text{Fläche}} = \eta \frac{\partial v_x}{\partial y} = \eta q \quad (2-16)$$

q = Geschwindigkeits- bzw. Schergefälle

τ = Schubspannung

Für so genannte „Newtonsche Flüssigkeiten“ ist die Viskosität konstant, das bedeutet, dass die Viskosität dieser Flüssigkeiten nicht von der angelegten Scherrate abhängt.

Auch Polymere in Lösung zeigen bei kleinen Schergeschwindigkeiten (bzw. Schubspannungen) Newtonsches Verhalten^[24, 67, 68].

Nimmt die Viskosität einer Flüssigkeit mit der Scherrate zu, so spricht man von dilatantem oder scherverdickendem Verhalten; nimmt die Viskosität mit steigender Scherrate ab, so liegt strukturviskoses oder scherverdünnendes Verhalten vor (Abbildung 2.17)^[70, 71].

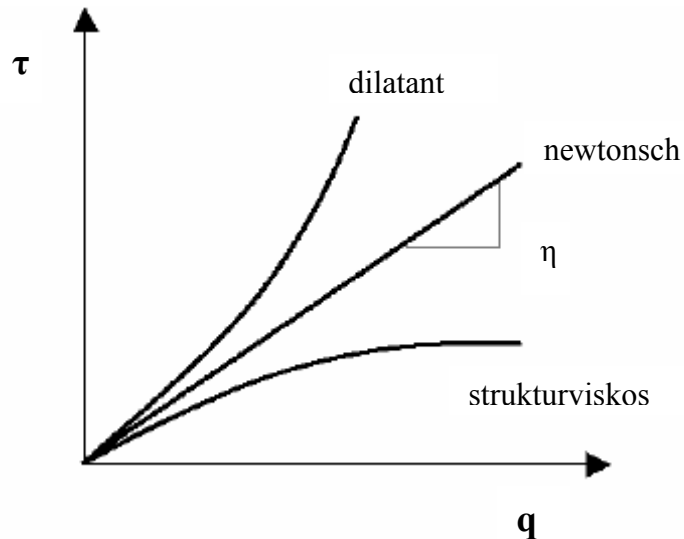


Abbildung 2.17: Scherratenabhängigkeit der Schubspannung bei dilatantem, newtonschem und strukturviskosem Fließverhalten.

Linear aufgebaute Polymere sind häufig fadenförmige Moleküle, welche in verdünnten Lösungen allgemein die Form eines statistischen Knäuels einnehmen (Abbildung 2.18). Durch die Wechselwirkungen dieser Knäuel miteinander und mit den Lösungsmittelmolekülen steigt die Viskosität η gegenüber der des reinen Lösungsmittels η_s an^[72, 73].

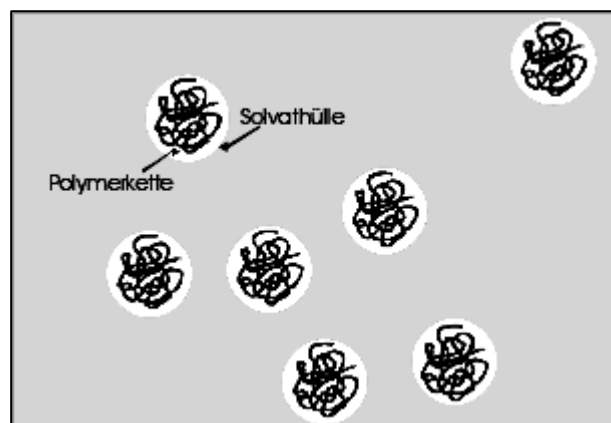


Abbildung 2.18: Statistische Polymerknäuel in Lösung.

Dieser Viskositätsanstieg wird durch die relative Viskosität η_{rel} beschrieben.

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_s} \quad (2-17)$$

Die Viskositätserhöhung, die ein Lösemittel durch die darin gelösten Makromoleküle erfährt, wird durch die spezifische Viskosität η_{sp} gegeben:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s} = \eta_{rel} - 1 \quad (2-18)$$

Die spez. Viskosität hängt in einer sehr verdünnten Lösung von dem Volumenbruch Φ des Polymers ab, der das Volumen der gelösten Makromoleküle in Relation zum Gesamtvolumen der Lösung beschreibt. Dieses Verhältnis wurde näherungsweise von Einstein für dispergierte Vollkugeln ermittelt:

$$\eta_{sp} = 2,5 \cdot \Phi \quad (2-19)$$

wobei gilt:

$$\Phi = \frac{\text{Volumen der gelösten Makromoleküle}}{\text{Volumen der Lösung}} = \frac{m/\rho_{\text{äqu}}}{V} = \frac{c}{\rho_{\text{äqu}}} \quad (2-20)$$

mit Φ = Volumenanteil der Polymerknäuel, m = Masse des Polymerfadens, $\rho_{\text{äqu}}$ = Dichte des leeren Polymerknäuels ohne Lösungsmittel und m/v = Polymermasse pro Volumenelement der Lösung (Polymerkonzentration c)

Für die spez. Viskosität ergibt sich somit:

$$\eta_{sp} = 2,5 \cdot \frac{c}{\rho_{\text{äqu}}} \quad (2-21)$$

Die Viskositätserhöhung ist somit in sehr verdünnter Lösung direkt proportional zur Konzentration des Polymers. Sie hängt aber auch von der Dichte, also dem Aufweitungsgrad des Polymerknäuels ab. Gegenüber der Viskosität von reinen Lösungsmitteln erhöhen Polymere die Viskosität einer Lösung umso stärker, je höher ihr Molekulargewicht ist, da hier die Knäuelichte abnimmt. Die Knäuelichte ist die eigentlich interessante Größe, die es zu bestimmen gilt, denn in sie gehen nicht nur die Einflüsse der Polymer/Lösungsmittel-Wechselwirkungen oder der chemischen Struktur des Polymers, die die Steifigkeit der Polymerkette in Lösung bestimmt, ein, sondern sie erlaubt auch direkt die Kalkulation der Polymerknäuelgröße in der Lösung.

All die gezeigten Gleichungen gelten nur in sehr verdünnter Lösung, wenn sich die gelösten Polymere nicht gegenseitig behindern ($c \rightarrow 0$). Für höhere Konzentrationen können diese Wechselwirkungen durch eine Potenzreihenentwicklung mit berücksichtigt werden:

$$\eta_{sp} = \frac{2,5 \cdot c}{\rho_{\text{äqu}}} + K_1 \cdot \left(\frac{c}{\rho_{\text{äqu}}} \right)^2 + K_2 \cdot \left(\frac{c}{\rho_{\text{äqu}}} \right)^3 + \dots \quad (2-22)$$

Praktisch arbeitet man in der Viskosimetrie aber in Verdünnungsbereichen, in denen nur der quadratische Term noch eine Rolle spielt, der kubische und alle Terme höherer Ordnung können vernachlässigt werden.

Als Maß für die spezifische Fähigkeit des Polymers, die Viskosität einer Lösung zu erhöhen, wird die reduzierte Viskosität η_{red} angegeben. Sie ergibt sich aus der Division der spez. Viskosität durch die Konzentration c :

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (2-23)$$

Extrapoliert man die reduzierte Viskosität auf unendliche Verdünnung und Schergefälle null, erhält man als Grenzwert die intrinsische Viskosität $[\eta]$, welche auch als Staudingerindex bezeichnet wird.

$$[\eta] = \lim_{\substack{c \rightarrow 0 \\ q \rightarrow 0}} \eta_{\text{red}} \quad (2-24)$$

Wie die Polymerknäuel dichte selbst, ist der Staudingerindex $[\eta]$ ebenfalls ein Maß für die Volumenbeanspruchung (bzw. Knäuelaufweitung) des ungestörten Einzelmoleküls und hat die Einheit cm^3/g , was die reziproke Einheit der Dichte darstellt. Besonders bei hochmolekularen Systemen kann die Viskosität makromolekularer Lösungen merklich von der Schergeschwindigkeit abhängen, deshalb müssen die Messungen bei solchen Schergeschwindigkeiten durchgeführt werden, bei denen die Viskosität unabhängig von dieser ist, deshalb die Forderung $q \rightarrow 0$.

Ersetzt man die Dichte durch den Staudingerindex, so erhält man die von Huggins oder Schulz-Blaschke theoretisch abgeleiteten Potenzreihen, die jeweils nach dem zweiten Glied abgebrochen werden:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot c \quad \text{Huggins} \quad (2-25)$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_{SB} \cdot [\eta] \cdot \eta_{sp} \quad \text{Schulz-Blaschke} \quad (2-26)$$

Mit diesen Gleichungen lässt sich der Staudingerindex $[\eta]$ mit nur einer Messung bestimmen, wenn die Konstanten k_H bzw. k_{SB} bekannt sind.

Die Huggins-Gleichung entspricht, wenn man $k_H \cdot [\eta]^2$ zu einer Konstanten zusammenfasst, in ihrer Form genau den zu Potenzreihen entwickelten Gleichungen des osmotischen Drucks

und der Streuintensität bei der Lichtstreuung. Der Vorteil der Schulz-Blaschke-Beziehung besteht darin, dass sie über einen größeren Konzentrationsbereich einen linearen Zusammenhang zwischen η_{sp}/c und η_{sp} aufweist, als die Gleichung nach Huggins zwischen η_{sp}/c und c ^[74].

Die beim Auflösen eines makromolekularen Stoffes zu beobachtende Viskositätserhöhung ist nach Gleichung (2-21) umgekehrt proportional zur mittleren Dichte der Teilchen. Da es sich bei der Dichte um eine Stoffkonstante handelt, ist keine Abhängigkeit der Viskosität von der Teilchengröße zu beobachten. Dagegen nehmen kettenförmige makromolekulare Systeme in Lösung die Form eines statistischen Knäuels an, dessen Dichte mit steigender Molmasse abnimmt, wie sich aus der Irrflugstatistik ergibt. Deshalb ist nach dem Einstein'schen Gesetz zu erwarten, dass bei solchen Systemen der Grad der Viskositätserhöhung auch eine Funktion der Molmasse ist. Durch die grundlegenden Arbeiten von Kuhn und Mark konnte ein quantitativer Zusammenhang zwischen dem Staudingerindex und der Molmasse M des gelösten Polymers gezeigt werden.

$$[\eta] = K_{\eta} \cdot M^a \quad (2-27)$$

K und a sind für ein jeweiliges Polymer-Lösemittel-System Konstanten. Der Exponent a beschreibt die Abhängigkeit der Knäuel-dichte von der Molmasse und ist von der Geometrie des gelösten Moleküls, dem Verzweigungsgrad und der Konstitution und Konfiguration der Hauptkette abhängig.

Kompakte starre Kugeln, wie z. B. das dichtverzweigte Glycogen in Wasser, zeigen keine Abhängigkeit der Dichte von der Molmasse, d.h. $a=0$. Die relativ steifkettigen Makromoleküle von Cellulose, Xanthan und anderen Polysacchariden, deren Knäuel besonders stark aufgeweitet sind, zeigen eine stark ausgeprägte Dichteabhängigkeit von der Molmasse (a im Bereich von 1), während bei Polyelektrolyten in reinem Wasser der Wert von a gegen 2 geht. Bei Systemen mit $a=0,5$ spricht man von einem pseudoidealen Zustand. In diesem Zustand, auf den sich viele theoretische Betrachtungen zur Struktur von statistischen Knäueln beziehen, werden die intramolekularen Wechselwirkungen der Kettensegmente durch die Solvatationskräfte der Lösungsmittelmoleküle gerade kompensiert, so dass die Polymermoleküle scheinbar kräftefrei vorliegen. Solche Lösungsmittel entsprechen einem thermodynamisch schlechten Lösungsmittel. In thermodynamisch guten Lösungsmitteln sind hingegen die Polymerknäuel aufgrund der starken Solvationstendenz über den statistischen Idealzustand hinaus aufgeweitet, d.h. je besser das Lösungsmittel, desto geringer die Knäuel-dichte. Das Auflösen eines Polymers in einem thermodynamisch guten Lösungsmittel führt zu einer starken Viskositätserhöhung, während beim Lösen in einem schlechten

Lösungsmittel nur eine geringe Erhöhung der Viskosität beobachtet wird. Im Allgemeinen nimmt die Knäuelichte mit steigender Temperatur ab, so dass ein Lösungsmittel bei niedriger Temperatur ein schlechtes und bei höheren Temperaturen ein gutes Lösungsmittel darstellen kann^[70, 71, 74, 75].

Zur Untersuchung der Viskosität stehen grundsätzlich drei verschiedene Verfahren zur Verfügung.

- Kapillarviskosimeter
- Fallkörperviskosimeter
- Rotationsviskosimeter

2.4.2.1 Kapillarviskosimeter

Durch Anlegen einer Druckdifferenz an eine mit Flüssigkeit gefüllte Kapillare beginnt diese Flüssigkeit zu fließen. Die sich einstellende Fließgeschwindigkeit bildet ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil mit der höchsten Durchflussgeschwindigkeit in der Kapillarenachse und der Geschwindigkeit Null an der Kapillarenwand aus. Bei Newtonschen Flüssigkeiten ist die mittlere Fließgeschwindigkeit (Durchflussvolumen pro Zeiteinheit) zur angelegten Druckdifferenz direkt und zur Viskosität umgekehrt proportional.

Die wichtigsten Ausführungen des Kapillarviskosimeters sind das Ubbelohde-Viskosimeter und das Ostwald-Viskosimeter (Abbildung 2.19), bei denen die Flüssigkeit unter dem eigenen hydrostatischen Druck durch die Messkapillare fließt.

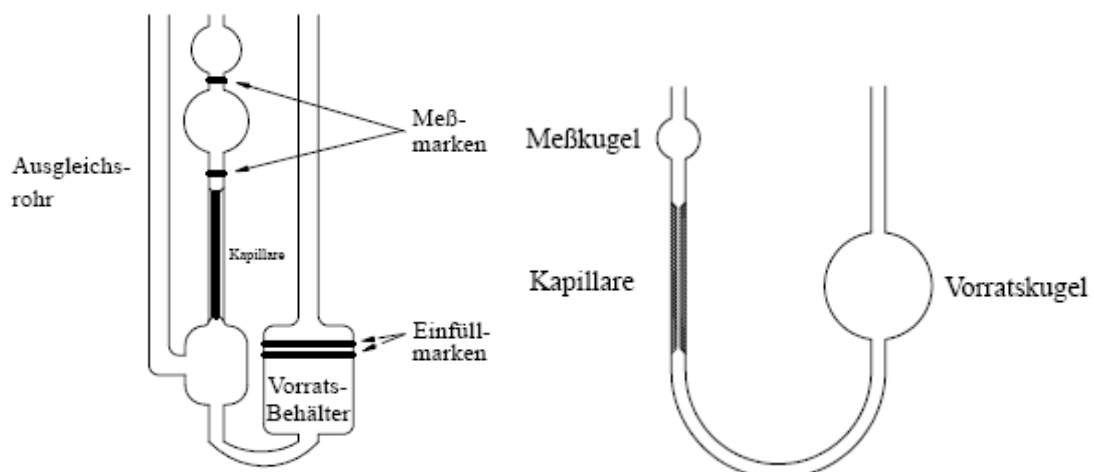


Abbildung 2.19: Ubbelohde- (links) und Ostwald-Viskosimeter (rechts) ^[76]

Mit diesen beiden Viskosimetertypen kann man nur sehr verdünnte Lösungen messen. Höhere Scherraten und Lösungen höherer Konzentrationen sind durch Anlegen eines hohen treibenden Drucks messbar. Dieses geschieht im Hochdruck-Kapillarviskosimeter. Die in die Probenflüssigkeit eintauchende Kapillare befindet sich dabei in einem Hochdruckbehälter. Bei Anlegen eines Druckes wird die Flüssigkeit in eine Messburette gepresst, die sich außerhalb des Druckbehälters befindet und daher unter Normaldruck steht. Anhand des Ansteigens der Probe in der Burette kann man die Durchflussgeschwindigkeit durch die Messkapillare messen.

2.4.2.2 Fallkörperviskosimeter

Bei einem Fallkörperviskosimeter wird eine Kugel in eine etwas schräg gestellte Röhre, die die Probenflüssigkeit enthält, von ihrem eigenen Gewicht nach unten getrieben. Dabei wird die Sinkgeschwindigkeit gemessen, welche umgekehrt proportional zur Viskosität des Mediums ist. In der Abbildung 2.20 wird ein Fallkugelviskosimeter nach Höppler gezeigt, welches nach diesem Prinzip arbeitet.

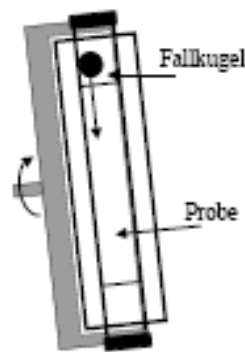


Abbildung 2.20: Fallkugelviskosimeter

2.4.2.3 Rotationsviskosimeter

Bei Rotationsviskosimetern wird das Drehmoment gemessen, welches angelegt werden muss, damit ein rotierender Körper mit einer bestimmten Drehgeschwindigkeit in einer Probenflüssigkeit rotieren kann.

Bei der einfachsten Ausführung wird ein Rührkörper in eine zu messende Flüssigkeit gehalten und das beim Drehen mit einer vorgegebenen Geschwindigkeit am Antrieb auftretende Drehmoment gemessen. Nach diesem Prinzip funktioniert das in der Praxis sehr häufig angewendete Brookfield-Viskosimeter (Abbildung 2.21).

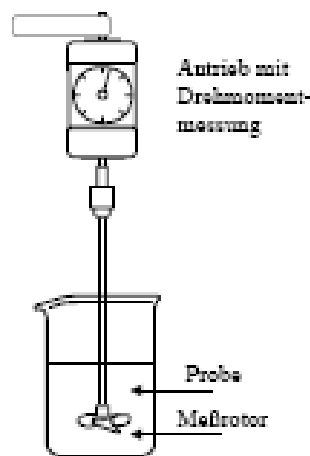


Abbildung 2.21: Brookfield-Viskosimeter

Dieses Prinzip, bei dem die wirksame Scherrate relativ undefiniert ist, eignet sich vorwiegend für orientierende Messungen und zur Produktionskontrolle. Genauere Messungen werden mit Rotationsviskosimetern durchgeführt, bei denen sich die Probe zwischen zwei koaxial beweglichen Drehkörpern befindet. Aus der Drehgeschwindigkeit des Rotors und der bekannten Proben- (Spalt-) Geometrie kann das mittlere Schergefälle berechnet werden. Aus den dazugehörigen Drehmomenten ergibt sich die Schubspannung. Auf diese Weise wird die Viskosität als Funktion verschiedener Scherraten bestimmt. Die Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate bezeichnet man als Fließkurve. Die häufigsten, geometrischen Messanordnungen solcher Viskosimeter sind koaxiale Zylinder (Abbildung 2.22), oder ein auf einer Platte aufgesetzter Kegel (Abbildung 2.23).

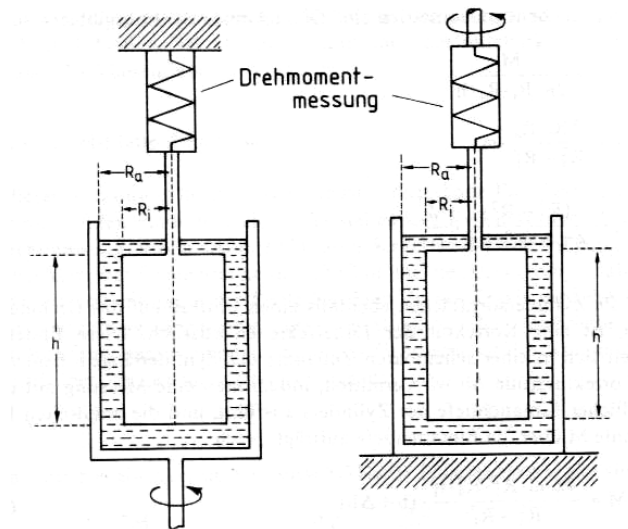


Abbildung 2.22: Rotationsviskosimeter nach Couette (links) und nach Searle (rechts) ^[70].

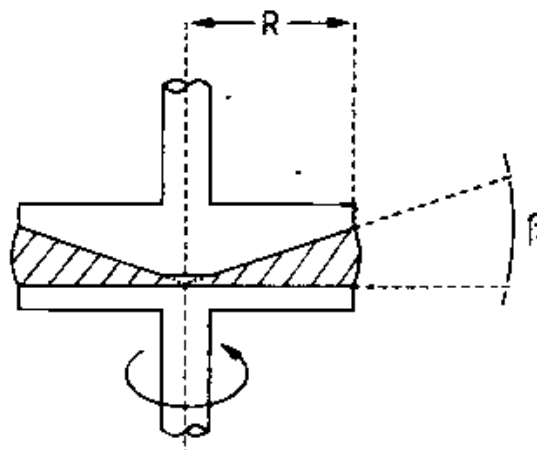


Abbildung 2.23: Kegel-Platte-Geometrie ^[70]

2.4.3 Rastersondenmikroskopie

Die Atomare Kraft-Mikroskopie (atomic force microscopy, AFM) bzw. Rasterkraftmikroskopie ist eine Messmethode, welche der sogenannten Rastersondenmikroskopie (scanning probe microscopy, SPM) zugeordnet ist^[77]. Dieser Terminus bezieht sich auf Analysemethoden, bei denen eine feine, lokal mit der Probe wechselwirkende Messsonde, die Oberfläche zeilenweise abrastert. Bei all diesen Messmethoden gilt, dass die finale Auflösung des jeweiligen Gerätes von der verwendeten Sonde und den zu erfassenden Wechselwirkungen abhängt. Je feiner die verwendete Sonde und je lokalisierter die Wechselwirkungen sind, umso höher ist die Auflösung^[77]. So ist es möglich, unter geeigneten Bedingungen, Bilder mit einer atomaren Auflösung zu erhalten.

Die von einem Rastersondenmikroskop aufgenommenen Daten werden als Funktion des jeweiligen Ortes detektiert und in einen Farbwert umgerechnet. Die Farbwerte jedes einzelnen Messpunktes werden dann zu einem Bild zusammengefasst. Das daraus resultierende Bild spiegelt die Probeneigenschaften wider, welche von den gemessenen Wechselwirkungen mit der Sonde abhängen^[77].

2.4.3.1 Atomare Kraft-Mikroskopie (AFM)

Die Atomare Kraft-Mikroskopie hat sich durch die Arbeiten von Binnig im Jahre 1986 zu einer Standardmethode der Oberflächencharakterisierung entwickelt^[78]. Besonders für Anwendungen in der Biotechnologie und der Biologie ist die Atomare Kraft-Mikroskopie geeignet^[77, 79]. Die Basis dieser Mikroskopieart bildet eine an der Unterseite eines flexiblen Federbalkens (Cantilever) befindliche Spitze, welche an die Probenoberfläche herangeführt wird und diese Zeile für Zeile abrastert. Dabei bilden die lokalen attraktiven oder repulsiven Kräfte zwischen Spitze und Probe die Grundlage der Messmethode. Diese Kräfte haben eine Auslenkung des Cantilevers zur Folge, wobei attraktive Wechselwirkungen dazu führen, dass sich der Cantilever zur Probe hin bewegt, und repulsive Kräfte ein Wegbewegen von der Oberfläche zur Folge haben^[77]. Da die Auslenkung s des Federbalkens analog zur Auslenkung der Feder betrachtet werden kann, besteht die Möglichkeit, unter Zuhilfenahme der Federkonstanten k_c des Cantilevers, die zwischen der Spitze und Probe wirkende Kraft mit Hilfe des Hookeschen Gesetzes (2-28) zu bestimmen^[77].

$$F = -k_c \cdot s \quad (2-28)$$

Mit Hilfe eines auf einem Laser basierenden Detektionssystems wird die Auslenkung des Federbalkens gemessen und in ein elektrisches Signal konvertiert. Hierzu wird auf die

Oberseite des Cantilevers ein Laserstrahl gerichtet, welche diesen reflektiert. (Abbildung 2.24)

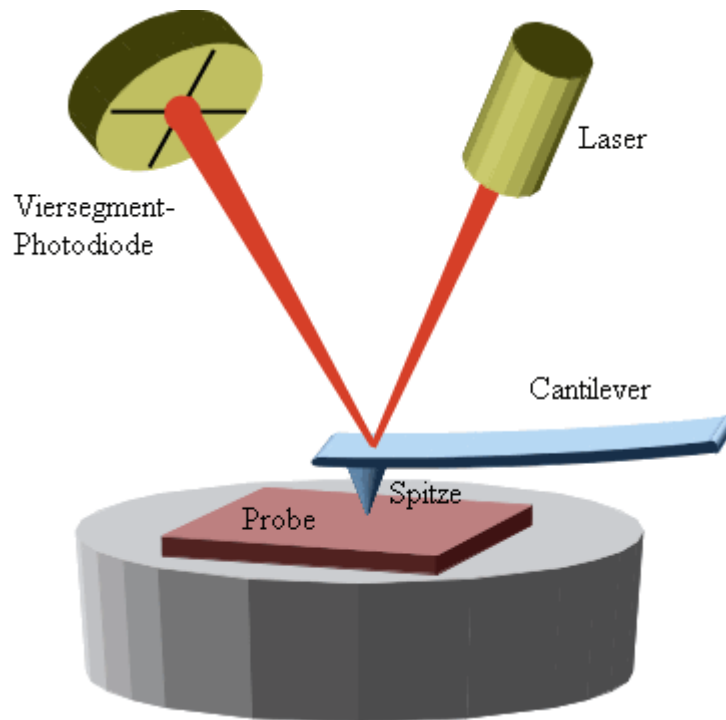


Abbildung 2.24: Schematische Darstellung der Messanordnung eines Atomaren Kraft-Mikroskops^[80].

Der reflektierte Laserstrahl leuchtet nun auf eine positionssensitive Viersegment-Photodiode. Dies ermöglicht es, nicht nur die vertikale Auslenkung, welche sich aus dem Höhenprofil ergibt, zu bestimmen, sondern außerdem noch die laterale Auslenkung bzw. Torsion des Federbalkens zu ermitteln, (Abbildung 2.25).

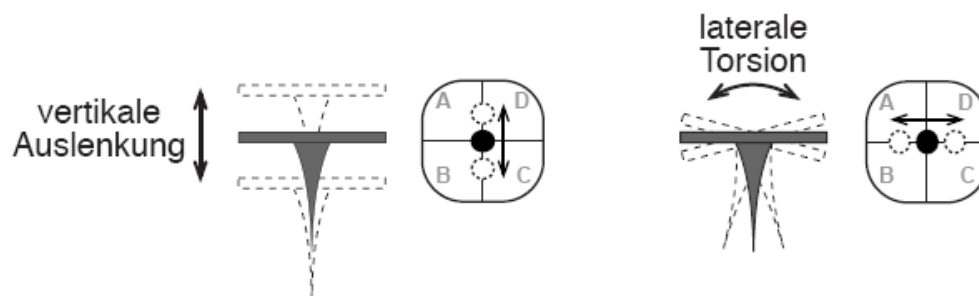


Abbildung 2.25: Schematische Darstellung der Auslenkungsmodi eines Federbalkens, einschließlich der Verschiebung des Laserstrahls auf der Viersegment-Photodiode^[81].

Bei der Atomaren Kraft-Mikroskopie kann je nach Art der Probe und Abbildungsansprüchen zwischen verschiedenen Betriebsmodi gewählt werden. Man unterscheidet zwischen dem sogenannten Contact-Mode, dem Non-Contact-Mode und dem Intermittent-Contact-Mode. Im Folgenden soll lediglich auf den letzten kurz eingegangen werden, da nur dieser in der vorliegenden Arbeit verwandt wurde.

Der Intermittent-Contact-Mode, ist auch unter dem Namen Tapping-Mode bekannt. Er ist eine Kombination aus dem Contact-Mode, bei dem die Cantileverspitze im dauerhaften Kontakt mit der Probenoberfläche steht, und dem Non-Contact-Mode, bei dem die Spitze die Probe nicht berührt. Der Intermittent-Contact-Mode stellt somit einen relativ guten Messmodus für empfindliche Proben dar. Er zeichnet sich dadurch aus, dass der Cantilever mit einer großen Amplitude nahe seiner Resonanzfrequenz zur Schwingung angeregt und so weit an die Oberfläche angenähert wird, dass es zu einem periodischen Kontakt zwischen Spitze und Probe kommt. Dieser wiederholte Kontakt führt zu einer Reduzierung der Oszillationsamplitude. (siehe Abbildung 2.26)

Intermittent-Contact-Mode

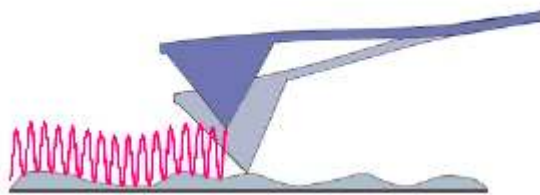


Abbildung 2.26: Schematische Darstellung des Intermittent-Contact-Modes^[77].

2.4.4 NMR-Spektroskopie

Den beiden Arbeitsgruppen um F. Bloch und M. E. Packard gelang 1946 unabhängig voneinander der Nachweis von Kernresonanz-Signalen. Daraus wurde die Methode der kernmagnetischen Resonanz (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) entwickelt. Diese ist im Laufe der Jahre für Naturwissenschaftler unabdingbar geworden und ist eine der wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung von Biomolekülen und besonders von Polysacchariden. Dies führte zu einer großen Anzahl an Veröffentlichungen auf diesem Gebiet^[82]. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit nur kurz auf die Grundlagen der Charakterisierung von Polysacchariden mittels NMR eingegangen.

Bei der NMR-Spektroskopie wird die Absorption als Funktion der Strahlungsfrequenz grafisch dargestellt. Zu einer der wichtigsten Anwendungen der ^1H -NMR-Spektroskopie zählt die Aufklärung von strukturellen Fragestellungen in der Biochemie. Dazu können eine Vielzahl von Informationen aus einem NMR-Spektrum herangezogen werden^[83]. Zu diesen Informationen gehören unter anderem die Anzahl chemisch nicht-äquivalenter Protonenkerne oder auch die Lage der Signale zur Ermittlung der chemischen Verschiebung und von Abschirmungseffekten. Des Weiteren liefern die Kopplungskonstanten, deren Multiplizität und die Peakflächen als Maß für die Anzahl von Kernen in einer Peakgruppe wichtige Informationen zur Strukturaufklärung. Außerdem lassen sich Informationen zur Molekülstruktur aus den Relaxationszeiten gewinnen, wenn diese im NMR-Experiment bestimmt wurden.

Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie weist gegenüber der von ^1H eine etwa 6000mal geringere Empfindlichkeit auf, was daran liegt, dass das ^{13}C -Isotop nur eine natürliche Häufigkeit von ca. 1% und das im Vergleich kleinere gyromagnetische Verhältnis aufweist^[84]. Aber durch eine geeignete Wahl der Experimente kann trotzdem die chemische Verschiebung in ^{13}C -Spektren zur Strukturaufklärung organischer und biochemischer Moleküle wie in der ^1H -NMR verwendet werden. Die Einflüsse der chemischen Umgebung des ^{13}C -Kerns können genau wie in der ^1H -Spektroskopie zur Aufklärung chemischer Strukturen betrachtet werden, denn die Wechselwirkungen sind hierbei nicht auf die unmittelbaren Nachbaratome beschränkt. So ist es möglich, Substitutionseinflüsse selbst über fünf C-Atome hinweg noch in Verschiebungseffekten nachzuweisen.

Die Möglichkeit der ^{13}C -NMR-Spektroskopie Informationen zum Kohlenstoff-Gerüst zu liefern macht sie so wertvoll. Im Vergleich dazu liefert das ^1H -NMR nur Informationen zur Wasserstoffperipherie der einzelnen Moleküle. In der ^{13}C -NMR ist außerdem die chemische Verschiebung mit ca. 200 ppm wesentlich breiter als für Protonenspektren. Zur Erleichterung

der Spektreninterpretation werden in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie häufig Doppel-Resonanz-Techniken eingesetzt. Hier ist besonders die Breitbandentkopplung zu nennen. Bei ihr wird die Spin-Spin-Kopplung von ^{13}C -Kernen mit ^1H -Kernen durch Bestrahlung der Probe mit einer breitbandigen Radiofrequenz, die im gesamten anregbaren ^1H -Resonanzbereich liegt, entkoppelt. (Abbildung 2.27)

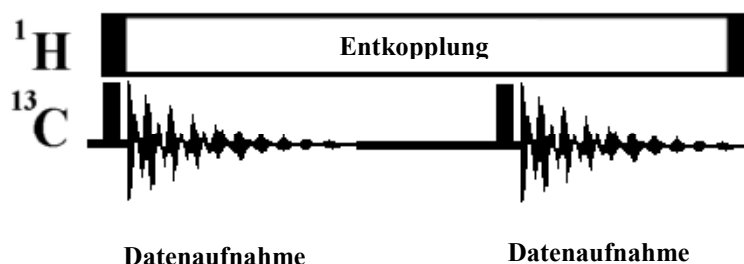


Abbildung 2.27: Darstellung der Impulsfolge bei der Breitbandentkopplung^[83].

Das entkoppelte ^{13}C -Spektrum ist, im Vergleich zum gekoppelten Spektrum, deutlich vereinfacht. Die Entkopplungsmethode hat aber den Nachteil, dass jegliche Information über ^{13}C , ^1H -Kopplungen verloren gehen^[83].

Unter zur Hilfenahme einer DEPT-Messung (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) ist es jedoch möglich, die Anzahl der direkt gebundenen Wasserstoffkerne am ^{13}C -Kern zu bestimmen. Bei dieser Methode ergeben ^{13}C -Kerne an denen kein Wasserstoffatom gebunden ist kein Signal^[85], so dass diese Information mit Daten aus anderen Experimenten einen erheblichen Beitrag zu einer qualitativen Analyse bietet. Als weiteres spricht für diese Messmethode, dass sie die Empfindlichkeit für die ^{13}C -Kerne, gegenüber einem normalen Entkopplungsexperiment, bis auf das Achtfache steigern kann.

In der Abbildung 2.28 ist die Impulsfolge für eine DEPT-Messung dargestellt.

Die bis hier vorgestellten Messmethoden gehören zu dem Bereich der eindimensionalen (1D) NMR-Spektroskopie. Häufig werden aber für kompliziertere Systeme Experimente der 2D-heteronuklear-korrelierten NMR-Spektroskopie benötigt. Jedoch stellt sich hierbei die Aufnahme der unempfindlichen ^{13}C -Kerne als sehr langwierig dar, weshalb eine normale 2D-NMR-Messung mit der C-H-COSY-Methode (Correlation Spectroscopy) gern durch ein inverses Verfahren, welches z.B. die HSQC-Methode (Heteronuclear Single Quantum Coherence) darstellt, ersetzt. Durch die Anwendung dieses Verfahrens lässt sich die Messzeit deutlich verkürzen. Während dieser Messung werden auf dem Kanal des unempfindlichen Kohlenstoffkerns Kohärenzen erzeugt, welche sich auf den empfindlichen Wasserstoffkern übertragen. Die so resultierenden Resonanzen des ^1H -Kerns werden nun gemessen und ergeben ein Spektrum, in dem die Heterokerne über die Ordinate zusammengeführt ($^1\text{H} = \text{X}$ -

Achse; ^{13}C = Y-Achse) werden. Da nur Signale von direkt gebundenen C- und H-Atomen aufgenommen werden, ist so eine genaue Zuordnung dieser Signale möglich^[86]. Die Impulsfolge für so ein HSQC-Experiment wird in der Abbildung 2.29 gezeigt. Diese stellt sich als sehr komplex dar, denn sie besteht sowohl im ^{13}C -Kanal, als auch im ^1H -Kanal aus einer Vielzahl von 90° - und 180° -Impulsen, welche durch die Zeiten τ und t_1 getrennt sind.

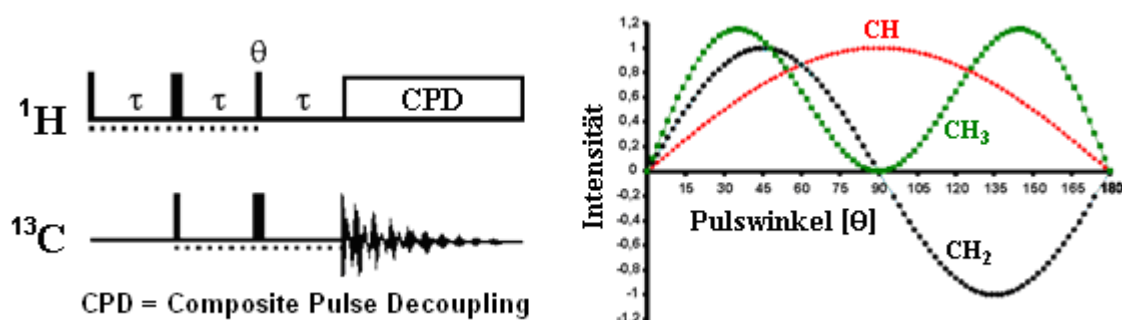


Abbildung 2.28: Darstellung der Impulsfolge bei einer DEPT-Messung. Der ^1H -Kern ist angeregt. Nach der Zeit τ entsteht ein Antiphasenterm, der mit Hilfe des 90° -Pulses auf ^{13}C in einem Multiquantenterm überführt wird. In der folgenden τ -Periode differenzieren die Operatortermine in Abhängigkeit von der Anzahl der direkt gebundenen Wasserstoffatome^[87].

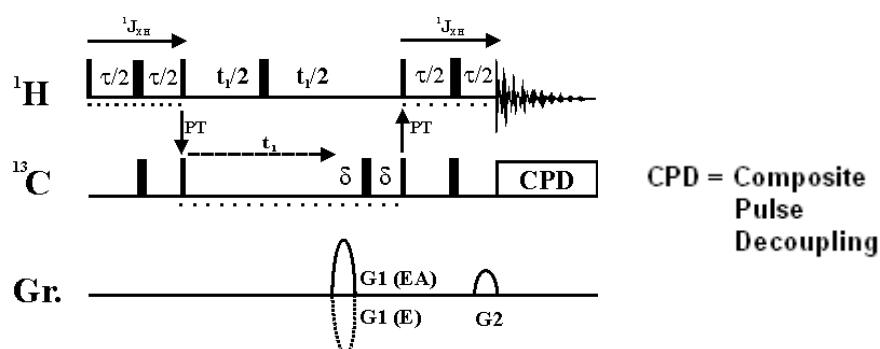


Abbildung 2.29: Darstellung der Impulsfolge bei einem HSQC-Experiment. Der ^1H -Kern ist angeregt. In der Zeit τ wird die Polarisation von ^1H auf ^{13}C übertragen. In t_1 entwickelt sich die ^{13}C -Verschiebung ohne ^1H -Kopplung. Die Magnetisierung dephasiert ein Gradient (Echo/Antiecho) in der Zeit δ . Der letzte Gradient (G2) τ rephasiert die gewünschte Magnetisierung nach einem Polarisationstransfer. Dann wird ^1H unter ^{13}C -Entkopplung detektiert^[86].

3 Material

3.1 Bakterielle Polysaccharide

In dieser Arbeit werden drei unterschiedliche Polysaccharide verwendet, die bewusst so ausgewählt wurden, denn sie sollen das große Feld der unterschiedlichen Grundtypen von Polysacchariden repräsentieren. Als erste Modellsubstanz für das Feld der ungeladenen Polysaccharide wird das verzweigte Dextran ausgewählt. Bei den ungeladenen Polysacchariden wird keine Unterscheidung zwischen unverzweigten und verzweigten Molekülen vorgenommen. Im Gegensatz dazu wird diese Unterscheidung bei den geladenen Polysacchariden vollzogen. Für die geladenen und unverzweigten Polysaccharide wird das Natriumsalz der Hyaluronsäure als Modellsubstanz verwendet. Für das Feld der geladenen und verzweigten Polysaccharide wird das Natriumsalz des Xanthans gewählt.

In der Tabelle 3.1 sind die verwendeten Polysaccharide mit ihren Bezugsquellen aufgelistet.

Tabelle 3.1: verwendete Polysaccharide

Substanzname	Hersteller	Best.-Nr.	CAS-Nr.
Dextran von <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Batch#:103K0053	Sigma	D4876-50G	9004-54-0
Hyaluronsäure (Natriumsalz) von <i>Streptococcus equi sp.</i> Filling Codes: 1317836 43007119 1351058 12108042 1420500 23609247	Fulka / Sigma	53747-10G	9067-32-7
Xanthan gum (Natriumsalz) Batch#:023K0185	Sigma	G12553-100G	11138-66-2

3.2 Chemikalien

Die übrigen für diese Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der folgenden Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: verwendete Chemikalien

Substanzname	Hersteller	Best.-Nr.	CAS-Nr.
Barium(II)-chlorid Dihydrat p.a.	Merck	101719500	10326-27-9
Chrom(III)-chlorid Hexahydrat p.a.	Fluka	27096100	10060-12-5
Cobalt(II)-acetat Tetrahydrat p.a.	Fluka	60790100	6147-53-1
Deuteriumoxid 99 atom % D	Aldrich	–	–
Natriumchlorid p.a.	Merck	1064041000	7647-14-5
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat p.a.	Fluka	72247250	7791-20-0

3.3 Geräte

Für die im Methodenteil dieser Dissertation beschriebenen, experimentellen Arbeiten wurden die in der Tabelle 3.3 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 3.3: verwendete Geräte

Geräte	Hersteller und Bezeichnung
AFM	JPK
AFM-Spitzen	NanoAndMore - NCH-SuperSharpSilicon TM -SPM-Sensor
Analysenwaage	Sartorius research ($\pm 0,02$ mg)
Analyzer f. Rotationsviskosimeter LS 40	Contraves
Dialyseschläuche	Serva; Visking dialysis tubing 27 mm
Gefriertrocknungsanlage	Christ alpha 1 - 4
1. Konduktometer mit dazugehöriger Elektrode	LF 537/537-A WTW mit Tetracon 96 WTW
2. Konduktometer mit dazugehöriger Elektrode	Metrohm 712 Conductometer Conductometric cell mit Pt 100 (6.0912.110)
Kryostat	Mgw/Lauda klein Kryomat C6CT
Magnetrührer	IKA-Combimag RCT
NMR-Geräte	Avance II – 400 von Bruker DRX-500 von Bruker
1. Pipette	Eppendorf Reference 50-200 μ L
2. Pipette	Eppendorf 1, 2, 3, 4 oder 5 μ L
Rotationsviskosimeter	Low shear 40 Contraves
Steuereinheit f. LS 40	Contraves
Thermometer	mgw Lauda R 40/2 Digital Thermometer
Thermostat	Reotherm 115 contraves 3
Ultraschallfinger	Branson – Digital Sonifier [®] W-250D
Zentrifuge	Hettich Universal 2S

Des Weiteren werden noch Glasgeräte wie z.B.: Bechergläser, Messkolben, Messzylinder usw. verwendet, die zur Laborausstattung gehören.

4 Experimenteller Teil

4.1 Reinigung der Polysaccharide

4.1.1 Reinigung von Hyaluronsäure

Für die Abtrennung niedermolekularer Fremdkörper und für den Ionenaustausch kommen im ersten Schritt der Reinigung Dialyseschläuche mit einer Abschlussgrenze von ca. 12000 Dalton zum Einsatz. Um die Zelluloseschläuche flexibel und steril zu erhalten, werden diese gemäß der Herstelleranleitung in destilliertem Wasser ausgekocht. Es ist darauf zu achten, dass sich die Schläuche während des Kochens immer vollständig unter Wasser befinden. Dies wird durch Einsatz eines etwas kleineren Becherglases, welches ebenfalls mit etwas dest. Wasser gefüllt ist, und in das erste Becherglas gestellt wird erreicht. Nach dem 30-minütigen Auskochen werden die Dialyseschläuche auf Raumtemperatur abgekühlt, damit sie später weiterverwendet werden können.

Über den Zeitraum von einer Stunde werden 1,2 g Hyaluronat in 600 ml 0,1 molarer Natriumchlorid-Lösung gelöst. Im Anschluss daran wird diese Lösung drei Stunden mit Hilfe eines Ultraschallfingers bei einer maximalen Temperatur von 50°C und einer Amplitude von 30% beschallt. Der beim mechanischen Abbau entstandene gräuliche Niederschlag, wobei es sich im Wesentlichen um Titanabrieb handelt, wird zusammen mit den restlichen unlöslichen Partikeln mittels Zentrifugation (4000 g, 2 h) abgetrennt.

Den Lösungsüberstand, welcher abdekantiert wird, füllt man in zwei ausgekochte Dialyseschläuche. Diese werden verschlossen und in je fünf Liter deionisiertem Wasser unter leichtem Rühren dialysiert. Während der Dialyse wird das Wasser in folgenden Abständen erneuert. Zunächst wird zweimal das Wasser nach je 15 Minuten Dialyse gewechselt, im Anschluss daran dann viermal nach je 30 Minuten. Nach dem letzten Wasserwechsel wird die Dialyse noch weitere 12 Stunden lang durchgeführt.

Nach Beendigung der Dialyse wird die Lösung aus den Schläuchen in gleichen Teilen in acht 250 ml-Rundkolben gefüllt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese gefrorene Lösung wird zur Trocknung für eine Dauer von zwei Tagen bei einem Druck von 0,5 mbar an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen, wodurch ein weißer flockiger Feststoff anfällt.

4.1.2 Reinigung von Xanthan

Für die Aufarbeitung von Xanthan werden die zu verwendenden Dialyseschläuche wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben ausgekocht.

Das Xanthan (1,2 g) wird in 600 ml 0,1 molarer Natriumchlorid-Lösung innerhalb einer Stunde gelöst und anschließend einer dreistündigen Ultraschallbehandlung ($T_{\max} = 50^{\circ}\text{C}$) unterzogen. Der beim Beschallen entstandene Niederschlag wird durch Filtration und anschließender Zentrifugation (2 Std.; 4000 g) abgetrennt.

Daraufhin wird die Lösung in die ausgekochten Dialyseschläuche gefüllt und die anschließende Dialyse wird, wie bei der Hyaluronsäure beschrieben, durchgeführt.

Diese dialysierte Lösung wird, wie bei der Hyaluronsäure, in acht Rundkolben (250 ml) gegeben und anschließend mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach werden die Kolben bei einem Druck von 0,5 mbar zur Trocknung an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen. Nach zwei Tagen erhält man gereinigtes und getrocknetes Xanthan.

4.2 Konduktometrische Titration

Für die konduktometrische Titration werden 0,05 molare wässrige Lösungen von den verschiedenen Schwermetallsalzen (BaCl_2 , CrCl_3 , $\text{CoC}_4\text{H}_6\text{O}_4$, CuCl_2 , FeCl_2 und NiCl_2) angesetzt. Das zu vermessende Polysaccharid (50 mg – 300 mg) wird in der Messzelle in 100 ml deionisiertem Wasser über einen Zeitraum von einer Stunde unter Rühren bei 25°C ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) gelöst. Es ist darauf zu achten, dass die Geschwindigkeit des Magnetrührers über den ganzen Zeitraum des Versuchs konstant ist. Die Temperatur wird über einen Thermostaten, der an die Messzelle angeschlossen ist, geregelt.

Nach dem Lösen des jeweiligen Polysaccharids wird die entsprechende Salzlösung in 100 μl -Schritten unter Rühren hinzutitriert. Im Anschluss an jede Zugabe wird gewartet, bis sich der Gleichgewichtszustand eingestellt hat. Dann wird die Leitfähigkeit bei einer konstanten Temperatur von 25°C bestimmt und notiert. Die so erhaltenen Leitfähigkeitswerte (κ) werden gegen die Konzentration (c) des dazu titrierten Salzes aufgetragen. In den so resultierenden Graphen werden durch Anlegen von Ausgleichsgeraden Diskontinuitäten, welche von den Wechselwirkungen zwischen Polysaccharid und Metall herrühren, und der damit verbundene Äquivalenzpunkt nachgewiesen. Außerdem kann man den Äquivalenzpunkt unter Zuhilfenahme der Ableitung der Leitfähigkeitsfunktion erhalten. Diese sollte oberhalb der Äquivalenzkonzentration annähernd konstant sein, bzw. minimale Änderungen aufweisen.

$$\frac{dc}{d\kappa} \cong \text{const.} \quad (4-1)$$

Das stöchiometrische Verhältnis zwischen dem Schwermetallkation und der Monomereinheit des jeweiligen Polysaccharids kann berechnet werden, wenn die Stoffmenge n_{MP} der Monomereinheit des Polysaccharids bekannt ist. Diese kann über die Gleichung 4-2 bestimmt werden.

$$n_{MP} = \frac{c_P \cdot V}{M_{MP}} \quad (4-2)$$

Dabei stellt c_P die Konzentration des Polysaccharids in der Lösung, V das Volumen der Lösung und M_{MP} die Molmasse einer Monomereinheit des jeweiligen Polysaccharids dar.

Nun kann das stöchiometrische Verhältnis $Q_{K/MP}$ zwischen Kation und Monomereinheit bestimmt werden, in dem man den Quotienten von der Stoffmenge n_K des Schwermetallsalzes am Äquivalenzpunkt und der Stoffmenge n_{MP} der Monomereinheit bildet.

$$Q_{K/MP} = \frac{n_K}{n_{MP}} \quad (4-3)$$

Des Weiteren kann mit der Konduktometrischen Titration eine Aussage über die Stabilität des jeweils gebildeten Komplexes getroffen werden. Dazu bildet man die Differenz ($\Delta\kappa^*$) zwischen der Leitfähigkeit bei der Titration des Salzes in wässriger Lösung ($\kappa_{\text{Salzls.}}$) und der Leitfähigkeit der entsprechenden Polysaccharidlösung am Äquivalenzpunkt ($\kappa_{\bar{A}}$) bei identischer Konzentration.

$$\Delta\kappa^* = (\kappa_{\text{Salzls.}} - \kappa_{\bar{A}}) + k_0 \quad (4-4)$$

k_0 stellt dabei eine Konstante dar, die die Größe der Startleitfähigkeit bei der Polymerlösung annimmt. Sie muss dazuaddiert werden, um den Startwert der wässrigen Lösung dem Startwert der Polymerlösung anzugleichen.

In Abbildung 5.4 ist eine exemplarische Abbildung dafür gezeigt.

Um zu überprüfen, ob die so erhaltenen Verläufe für die Leiffähigkeitsmessungen und die dazu ermittelten Äquivalenzpunkte realistisch sind, wurde die folgende Anpassungsfunktion entwickelt:

$$\kappa = (\Lambda_0(P + Me) * \sqrt{c(BP)}) * c(BP) + (\Lambda_0(A) * \sqrt{c(A)}) * c(A) + (\Lambda_0(Me) * \sqrt{c(A_{frei})}) * c(A_{frei}) \quad (4-5)$$

$$\text{mit} \quad c(A_{frei}) = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4 * K * (-c(Me))}}{2 * K} \quad (4-6)$$

κ = spezifische Leitfähigkeit

Λ_0 = molare Grenzleitfähigkeit

$c(P)$ = Konzentration des Polysaccharids

$c(Me)$ = Konzentration der Metallkationen

$c(A)$ = Konzentration der Anionen

$c(BP)$ = Konzentration der Bindungspunkt

Die erfolgten Messungen sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Tabelle 4.1: Durchgeführte konduktometrische Messungen

	BaCl ₂	CrCl ₃	CoC ₄ H ₆ O ₄	CuCl ₂	FeCl ₂	NiCl ₂
Dextran						
0,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,0 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
2,0 mg/mL	X	X	X	-	-	X
2,5 mg/mL	X	X	X	-	-	X
3,0 mg/mL	-	X	X	-	-	-
Hyaluronsäure						
0,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,0 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
2,0 mg/mL	X	X	X	X	X	X
2,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
3,0 mg/mL	-	X	X	X	X	X

	BaCl ₂	CrCl ₃	CoC ₄ H ₆ O ₄	CuCl ₂	FeCl ₂	NiCl ₂
Xanthan						
0,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,0 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
2,0 mg/mL	X	X	X	X	X	X
2,5 mg/mL	X	X	X	-	-	X

4.3 Rotationsviskosimetrische Titration

Für die Rotationsviskosimetrie werden Lösungen der verschiedenen Schwermetallsalze (BaCl₂, CrCl₃, CoC₄H₆O₄, CuCl₂, FeCl₂ und NiCl₂) mit einer Konzentration von 0,05 mol/L hergestellt. Die verwendete Menge des jeweiligen Polysaccharids (25 -125 mg) wird in 50 ml destilliertem Wasser bei einer konstanten Temperatur von 25°C (±0,1°C) über einen Zeitraum von einer Stunde gelöst. Während des Lösungsvorgangs wird die Polysaccharidlösung mit einer konstanten Geschwindigkeit gerührt. Dass die Temperatur über den ganzen Zeitraum des Versuches konstant bleibt, gewährleistet ein Temperierbecher, in dem sich die Polysaccharidlösung befindet und der durch einen Kryostaten temperiert wird. Gleichzeitig wird das Rotationsviskosimeter ebenfalls von diesem Kryostaten temperiert, damit gewährleistet ist, dass sich die zu vermessende Lösung bei der Messung nicht abkühlt.

Als erstes wird das Rotationsviskosimeter mit destilliertem Wasser kalibriert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Viskosität von Wasser im Bereich von 0,9 bis 1,1 mPa·s bei 25°C liegen sollte. Wenn dies nicht der Fall ist, müssen die Einstellungen des Rotationsviskosimeters überprüft werden und gegebenenfalls der Torsionsdraht neu justiert werden. Im Anschluss daran wird die entsprechende Menge (ca. 4 mL) der zu vermessenden Polysaccharidlösung in den Zylinder des Rotationsviskosimeters gegeben und vermessen. Beim Umfüllen der zu vermessenden Lösung ist dabei darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen in der Flüssigkeit befinden, denn diese führen zu Messungenauigkeiten. Nach jeder Messung wird der Inhalt des Zylinders wieder in den Temperierbecher mit der Stammlösung zurückgegeben und 50 µL der entsprechenden Salzlösung hinzutitriert. Dann wartet man ca. zwei Minuten, damit sich ein Gleichgewicht einstellen kann, bevor man die Viskosität dieser Lösung bestimmt.

Jede Messung wird fünfmal wiederholt, um eine Reproduzierbarkeit sicherzustellen. Erst im Anschluss daran wird die vermessene Lösung in den Temperierbecher zurückgegeben und die nächsten 50 μL Salzlösung dazutitriert.

Für die Aufnahme der einzelnen Messwerte werden eine Schergeschwindigkeit von $2,0 \text{ s}^{-1}$, ein Tiefpassfilter von 2 Hz und ein Empfindlichkeitsbereich vom 1/125 gewählt.

Die so erhaltenen einzelnen Viskositäten werden abschließend gegen die entsprechenden Salzkonzentrationen in einem Graphen aufgetragen. Durch Anlegen einer Ausgleichsgeraden kann der Äquivalenzpunkt für die rotationsviskosimetrische Titration bestimmt werden. Unter Zuhilfenahme dieses Äquivalenzpunktes kann, wie schon im Abschnitt 4.2 beschrieben, das stöchiometrische Verhältnis zwischen den Schwermetallkationen und der Polymermonomereinheit bestimmt werden.

Die praktizierten Messungen sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Durchgeführte rotationsviskosimetrische Messungen

	BaCl	CrCl ₃	CoC ₄ H ₆ O ₄	CuCl ₂	FeCl ₂	NiCl ₂
Dextran						
0,5 mg/mL	X	-	-	-	-	X
1,0 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
2,0 mg/mL	X	-	-	-	-	X
2,5 mg/mL	X	-	-	-	-	X
Hyaluronsäure						
0,5 mg/mL	X	-	-	-	-	X
1,0 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
2,0 mg/mL	X	-	-	-	-	X
2,5 mg/mL	X	-	-	-	-	X
Xanthan						
0,5 mg/mL	X	-	-	-	-	X
1,0 mg/mL	X	X	X	X	X	X
1,5 mg/mL	X	X	X	X	X	X
2,0 mg/mL	X	-	-	-	-	X
2,5 mg/mL	X	-	-	-	-	X

Außerdem wurden die Viskositäten im von 1 mg/mL Hyaluronsäure- und Xanthanlösungen nach der Zugabe von 750 µL 0,05 molarer Salzlösung über einen Zeitraum von zwei Wochen beobachtet. Dies wurde so durchgeführt, dass man am ersten Tag Messungen nach einer, zwei, vier und sechs Stunden bei einer Temperatur von 25°C vollzog. Danach wurde für diese vier Lösungen nun täglich eine Viskositätsmessung bei 25°C durchgeführt. Nach Beendigung der täglichen Messungen wurden diese Lösungen im Kühlschrank aufbewahrt.

4.4 Atomare Kraft-Mikroskopie (AFM)

Zur Charakterisierung der verschiedenen Polysaccharide mittels der Atomaren Kraft-Mikroskopie wird zunächst die erforderliche Menge des jeweiligen Polysaccharids (0,01 mg/mL – 1,0 mg/mL) unter Rühren in bi-destilliertem Wasser gelöst. Außerdem werden die Polysaccharide in den gleichen Konzentrationen in bi-destilliertem Wasser gelöst und die Äquivalentkonzentration an Schwermetallsalz (0,05 molar), welches ebenfalls in bi-destilliertem Wasser gelöst ist, dazugegeben. 5 µL der zu vermessenden Lösung werden jeweils auf einen „frisch gebrochenen Glimmer-Träger“ von NanoAndMore gegeben, welche auf einem Stahlobjektträger befestigt ist. Im Anschluss daran wird der Objektträger auf einen Nickeltiegel, der in einem Dewar mit flüssigem Stickstoff liegt, platziert und so die 5 µL Probenlösung schockgefroren. Um sicher zu gehen, dass die Probe nicht gleich wieder auftaut, lässt man den Objektträger ca. eine Minute auf dem Tiegel liegen. Die Trocknung der Probe wird mit einer Gefriertrocknungsanlage durchgeführt; anschließend wird sie in einem Vakuumexsikkator aufbewahrt.

Für die AFM-Messungen wird ein NCH-SuperSharpSiliconTM-SPM-Sensor, mit einer Dicke von $4,0 \pm 1 \mu\text{m}$, einer Spitzenhöhe von 10-15 µm und einem Spitzenradius von 2 nm, verwendet. Für die verschiedenen Aufnahmen werden die Auflösung (512 x 512 Pixel – 4096 x 4096 Pixel), die Scanrate (0,25 Hz – 1,0 Hz) und der laterale Scanbereich (1,0 x 1,0 µm – 100 x 100 µm) variiert.

4.5 NMR-Spektroskopie

Die zu vermessenden Polysaccharide werden in D₂O gelöst. Zur Aufnahme der NMR-Spektren wird ein Avance II-400- und ein DRX-500-Spektrometer der Firma Bruker verwendet, bei den Messungen wird die Deuteriumresonanz als „field-frequency-lock“ verwendet. Während der Messungen wird die Temperatur des Messkopfes konstant bei 60°C gehalten.

Die Aufnahme der ¹³C-NMR-Spektren erfolgt mit 64K x 1024 Datenpunkten und einer spektralen Weite von 32680 Hz. Die Anregung der Proben erfolgt durch einen 90°-Puls und die Wartezeit zwischen zwei Pulsen beträgt 2,5 Sekunden. Im Verlauf einer Messung werden 5000–6000 Scans durchgeführt und die Messung wird im „Reversed-Gated-Decoupling-Mode“ durchgeführt, weil mit dieser Methode eine Aufnahme der Spektren ohne Kern-Overhauser-Effekt möglich ist; infolge dessen kann außer der chemischen Verschiebung auch das Intensitätsverhältnis bei der Auswertung des jeweiligen Spektrums mit in Betracht gezogen werden.

Die ¹H-Spektren werden mit 64K x 512 Datenpunkten, sowie einer Spektralauflösung von 9980 Hz aufgezeichnet. Der Winkel der eingestrahlten Pulse beträgt 15° mit einer Wartezeit von 8,5 Sekunden zwischen den Pulsen.

Die 2D-NMR-Spektren werden unter Zuhilfenahme der „HSQC-Methode“ gemessen. Dabei werden 64K x 512 Datenpunkte gemessen und die spektrale Weite beträgt für den ¹³C-Kanal 7360 Hz und für den ¹H-Kanal 2650 Hz. Bei der „HSQC-Methode“ handelt es sich um eine inverse ¹H-¹³C-Korrelation. Diese schafft die Möglichkeit, in relativ kurzer Zeit eine heteronukleare Resonanzuntersuchung zu vollziehen.

Die Auswertung der aufgenommenen NMR-Spektren erfolgt auf der Grundlage der Signalzuordnung von bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen veröffentlichten Daten^[88-96]. Die Zuordnung der NMR-Signale aus den Experimenten mit bivalenten Schwermetallkationen erfolgt auf der Basis von Spektraldaten, die für reine Lösungen des jeweiligen Polysaccharids in Abhängigkeit von dem Abbauverfahren und der Konzentration des Polysaccharids erhalten werden.

5 Ergebnisse

5.1 Konduktometrie

Möchte man die Bindung zwischen bakteriellen Polysacchariden und Schwermetallionen charakterisieren, so ist es notwendig, die Wechselwirkungspositionen genauer zu untersuchen. Mit Hilfe der konduktometrischen Titration ist es möglich, den Äquivalenzpunkt zwischen dem jeweiligen Polysaccharid und dem Schwermetallkation zu bestimmen. Damit kann eine quantitative Aussage über die Wechselwirkungsposition gemacht werden. Die konduktometrische Titration wird wie in Kapitel 4.2 beschrieben vollzogen.

5.1.1 Leitfähigkeitsmessung von Dextran

Bei der konduktometrischen Titration der verschieden konzentrierten (0,5 mg/mL bis 3,0 mg/mL) Dextranlösungen können bei keiner der verwendeten Salzlösungen (0,05 molar BaCl_2 -, CrCl_3 -, $\text{CoC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ -, CuCl_2 -, FeCl_2 - und NiCl_2 -Lösung) Wechselwirkungen nachgewiesen werden. Somit können hier keine Äquivalenzpunkte bestimmt werden. Dies ist daran zu erkennen, dass am Anfang der Geraden keine Änderung der Steigung zu beobachten ist. Erst gegen Ende der Geraden tritt eine deutliche Abnahme der Steigung auf, welche auf das Kohlrausch'sche Quadratwurzel-Gesetz zurückzuführen ist. Ein Beispiel für die Messung einer Dextranlösung ist in Abbildung 5.1 gezeigt. Weitere Messungen von Dextranlösungen sind im Anhang abgebildet.

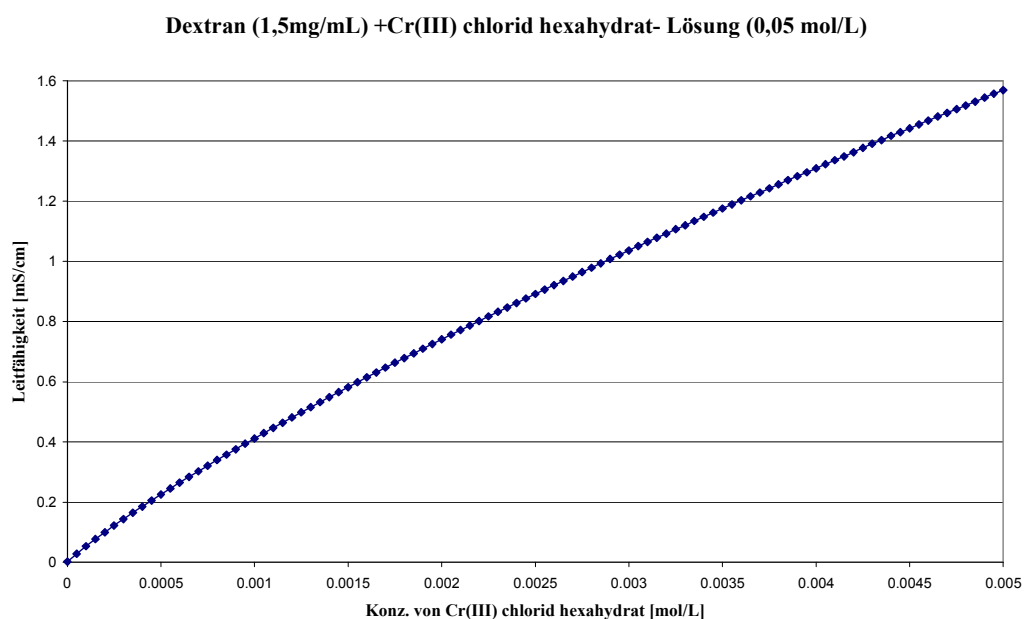


Abbildung 5.1: Beispiel für die Ergebnisse der konduktometrischen Messungen von Dextran

5.1.2 Leitfähigkeitsmessung von Hyaluronsäure

Die konduktometrischen Messungen mit Hyaluronsäurelösungen (0,5 mg/mL – 3,0 mg/mL) zeigen, dass zwischen den einzelnen Kationen (Ba^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} und Ni^{2+}) und der Hyaluronsäure Wechselwirkungen auftreten. Aufgrund der resultierenden Wechselwirkungen zwischen dem geladenen Polysaccharid und den hinzutitrierten Kationen gibt es einen diskontinuierlichen Verlauf der Leitfähigkeitsfunktion. Der Äquivalenzpunkt bei den einzelnen Messungen ist daran zu erkennen, dass im unteren Teil der Geraden eine Änderung der Steigung auftritt. Dieser wird in vorläufiger Form ermittelt, indem an die entsprechenden Geradenabschnitte Tangenten angelegt werden. Der Schnittpunkt dieser Tangenten stellt den Äquivalenzpunkt dar. Die so ermittelten Äquivalenzpunkte werden durch eine für diese Messungen entwickelte Fittfunktion bestätigt.

Zu Beginn der konduktometrischen Titration ist der Anstieg der gemessenen Leitfähigkeit im Vergleich zum restlichen Verlauf der Messung relativ gering. Erst nach der Überschreitung der Äquivalenzkonzentration des Kations wird die Steigung der Leitfähigkeitsfunktion größer und die Funktion verläuft kontinuierlich. Abweichungen von dem linearen Verlauf sind hinter dem Äquivalenzpunkt nur durch das Kohlrausche Quadratwurzel-Gesetz bedingt.

Ein exemplarischer Verlauf einer typischen Leitfähigkeitsmessung, bei der die Leitfähigkeit gegen die Kationenkonzentration aufgetragen ist, wird in Abbildung 5.2 gezeigt.

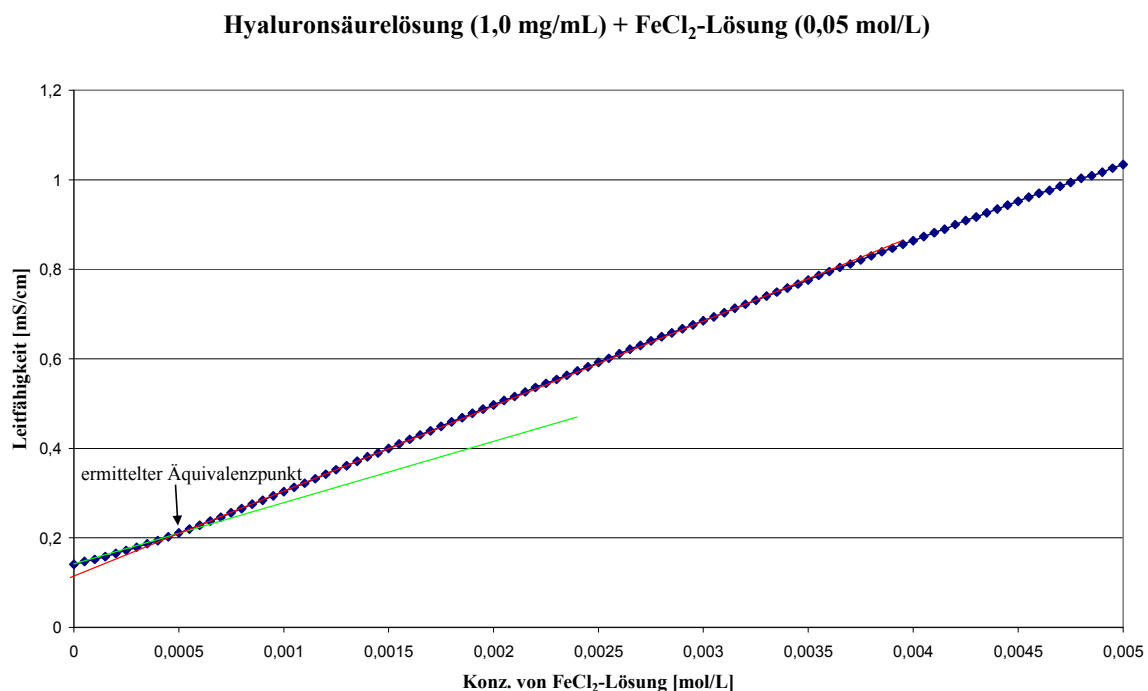


Abbildung 5.2: Exemplarische Abbildung der konduktometrischen Titration von Hyaluronsäure unter Zugabe von FeCl_2 -Lösung. Die Tangenten schneiden sich am Äquivalenzpunkt.

Des Weiteren gibt es eine zweite Möglichkeit den Äquivalenzpunkt zu bestimmen. Dazu wird das erste Differential der Leitfähigkeitsfunktion nach jeder Zugabe des entsprechenden Elektrolyten gegen die Konzentration des jeweiligen Kations aufgetragen. Mit dieser Methode ist es möglich, den Punkt (Äquivalenzpunkt), an dem alle Koordinationsstellen des Polysaccharids mit Kationen besetzt sind zu bestimmen. Diesen Punkt erkennt man daran, dass das erste Differential der Leitfähigkeitsfunktion anschließend annähernd konstant ist (Abbildung 5.3).

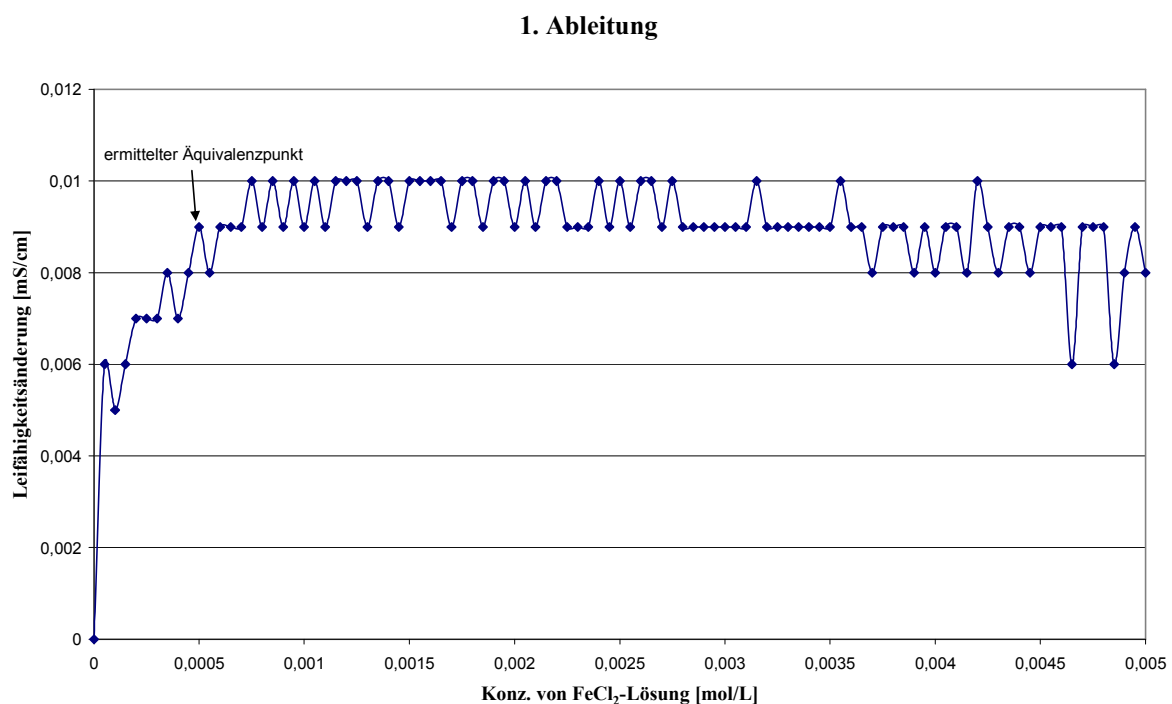


Abbildung 5.3: Ableitung der konduktometrischen Titration aus Abbildung 5.2

Meist werden beide Möglichkeiten zur Bestimmung des Äquivalenzpunktes miteinander kombiniert, um diesen genauer zu verifizieren.

Im Anhang sind von weiteren Messungen die Leitfähigkeitsgraphen dargestellt. Werden die Leitfähigkeitsgraphen untereinander verglichen, so ist zu erkennen, dass Variationen mit dem jeweiligen Kationen auftreten. Oberhalb des Äquivalenzpunktes sind unterschiedliche Steigungen der Graphen, welche von den molaren Leitfähigkeiten der entsprechenden Kationen abhängen, zu erkennen. Des Weiteren sind in den einzelnen Leitfähigkeitsgraphen zum Teil Diskontinuitäten vorhanden. Im Bereich der Äquivalenzzkonzentration sind diese auftretenden Diskontinuitäten ein charakteristisches Merkmal für die Stabilität des sich

zwischen den bakteriellen Polysacchariden und der Schwermetallkationen einstellenden Komplexes. Je ausgeprägter diese Diskontinuitäten sich darstellen, umso intensiver sind die auftretenden Wechselwirkungen. Die Differenz ($\Delta\kappa^*$) zwischen der Leitfähigkeit der Polysaccharidlösung am Äquivalenzpunkt und der Leitfähigkeit bei der Titration des Salzes in wässriger Lösung stellt ein Maß für die Intensität der auftretenden Wechselwirkungen dar und wird wie in Kapitel 4.2 beschrieben bestimmt. Ein Beispiel ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

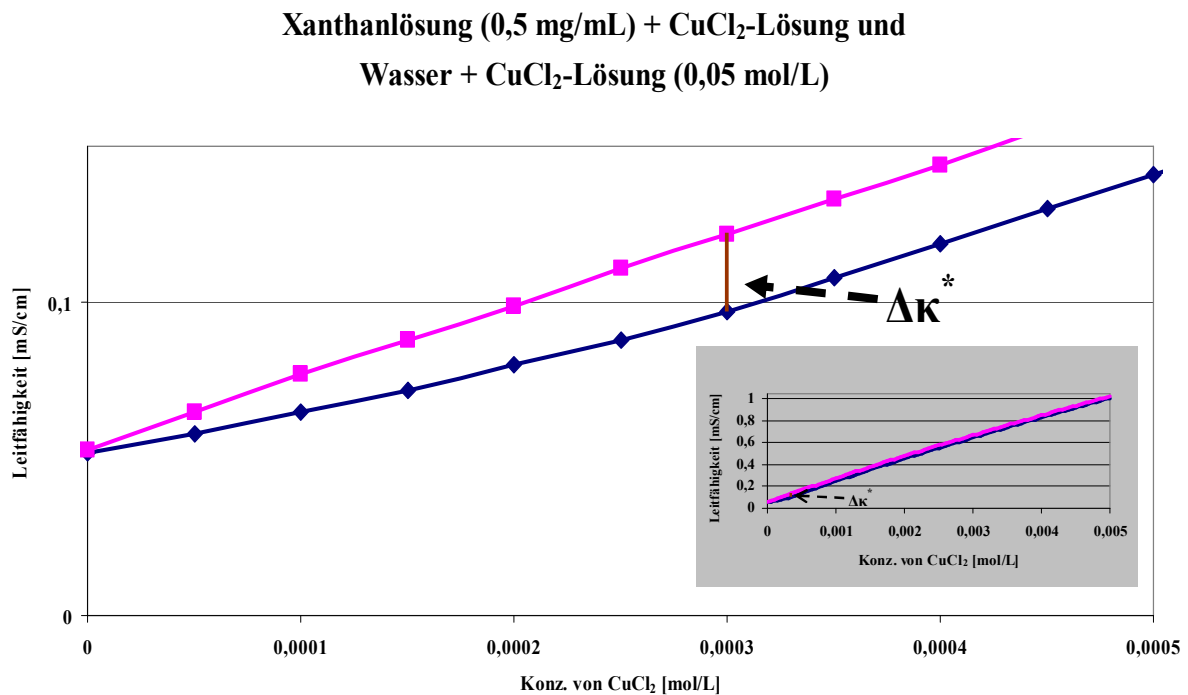


Abbildung 5.4: Exemplarische Darstellung zur Bestimmung von $\Delta\kappa$. Der **pinke** Graph stellt den Elektrolyten in Wasser dar, und der **blaue** Graph stellt den Elektrolyten in Polysaccharid (hier Xanthanlösung) dar.

Aus den Graphen der einzelnen Messungen der Hyaluronsäurelösungen kann man die Konzentration des jeweiligen Elektrolyten am entsprechenden Äquivalenzpunkt ablesen. Daraus ergeben sich für alle Messungen der verschiedenen Hyaluronsäurelösungen die in Tabelle 5.1 dargestellten Äquivalenzkonzentrationen (c_A).

Das stöchiometrische Verhältnis ($Q_{K/MP}$) zwischen dem Schwermetallkation und einer Monomereinheit der Hyaluronsäure wird wie in Kapitel 4.2 beschrieben berechnet. Dafür wird zuvor, mit der Kenntnis, dass die molare Masse einer Monomereinheit (M_{MP}) der Hyaluronsäure 395 g/mol beträgt, die Stoffmenge einer Monomereinheit (n_{MP}) der Hyaluronsäure gemäß der Gleichung (4-2) bestimmt. Diese Werte für $\Delta\kappa^*$ sind, ebenso wie das stöchiometrische Verhältnis ($Q_{K/MP}$), in Tabelle 5.2 angegeben.

Tabelle 5.1: Mittelwerte der Äquivalenzkonzentration $c_{\bar{A}}$ und der Stoffmenge n_K von Hyaluronsäurelösungen mit 0,05 mol/L der jeweiligen Metallsalzlösungen.

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	$c_{\bar{A}}$ [mol/L]	n_K [mol]
0,5	BaCl ₂	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
1,0	BaCl ₂	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	BaCl ₂	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$
2,0	BaCl ₂	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
2,5	BaCl ₂	$1,53 \cdot 10^{-3}$	$1,53 \cdot 10^{-4}$
3,0	BaCl ₂	-	-
0,5	CrCl ₃	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$
1,0	CrCl ₃	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$
1,5	CrCl ₃	$7 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-5}$
2,0	CrCl ₃	$9 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-5}$
2,5	CrCl ₃	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$
3,0	CrCl ₃	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$
0,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
1,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$
1,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$
2,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
2,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
3,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
0,5	CuCl ₂	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
1,0	CuCl ₂	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$
1,5	CuCl ₂	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$
2,0	CuCl ₂	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
2,5	CuCl ₂	$1,25 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$
3,0	CuCl ₂	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	$c_{\bar{A}}$ [mol/L]	n_K [mol]
0,5	FeCl ₂	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$
1,0	FeCl ₂	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	FeCl ₂	$8 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-5}$
2,0	FeCl ₂	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
2,5	FeCl ₂	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
3,0	FeCl ₂	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
0,5	NiCl ₂	$3,25 \cdot 10^{-4}$	$3,25 \cdot 10^{-5}$
1,0	NiCl ₂	$5,25 \cdot 10^{-4}$	$5,25 \cdot 10^{-5}$
1,5	NiCl ₂	$8,5 \cdot 10^{-4}$	$8,5 \cdot 10^{-5}$
2,0	NiCl ₂	$9,75 \cdot 10^{-4}$	$9,75 \cdot 10^{-5}$
2,5	NiCl ₂	$1,38 \cdot 10^{-3}$	$1,38 \cdot 10^{-4}$
3,0	NiCl ₂	$1,55 \cdot 10^{-3}$	$1,55 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 5.2: Mittelwerte des stöchiometrischen Verhältnisses ($Q_{K/MP}$) und der $\Delta\kappa^*$ -Werte von den verwendeten Kationen bei der konduktometrischen Titration von Hyaluronsäure.

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	n_K [mol]	n_{MP} [mol]	$Q_{K/MP}$	$\Delta\kappa^*$ [mS/cm]
0,5	BaCl ₂	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,8	0,08
1,0	BaCl ₂	$5,5 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,8	0,095
1,5	BaCl ₂	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,111
2,0	BaCl ₂	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$5,26 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,4	0,153
2,5	BaCl ₂	$1,53 \cdot 10^{-4}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,3	0,196
3,0	BaCl ₂	-	-	-	-
0,5	CrCl ₃	$2 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	1 / 6,6	0,053
1,0	CrCl ₃	$4 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 6,6	0,101
1,5	CrCl ₃	$7 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,6	0,152
2,0	CrCl ₃	$9 \cdot 10^{-5}$	$5,26 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,9	0,279
2,5	CrCl ₃	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	1 / 6,0	0,23
3,0	CrCl ₃	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$7,89 \cdot 10^{-4}$	1 / 6,1	0,262

c_p [mg/mL]	Elektrolyt	n_K [mol]	n_{MP} [mol]	$Q_{K/MP}$	$\Delta\kappa^*$ [mS/cm]
0,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,028
1,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$5 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,052
1,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,082
2,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1 \cdot 10^{-4}$	$5,26 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,099
2,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,5	0,113
3,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$7,89 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,144
0,5	CuCl ₂	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,027
1,0	CuCl ₂	$5 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,053
1,5	CuCl ₂	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,1
2,0	CuCl ₂	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$5,26 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,096
2,5	CuCl ₂	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,122
3,0	CuCl ₂	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$7,90 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,139
0,5	FeCl ₂	$4 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,3	0,030
1,0	FeCl ₂	$5 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,043
1,5	FeCl ₂	$8 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,9	0,064
2,0	FeCl ₂	$1 \cdot 10^{-4}$	$5,26 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,075
2,5	FeCl ₂	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,48	0,090
3,0	FeCl ₂	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$7,90 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3	0,114
0,5	NiCl ₂	$3,25 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,1	0,049
1,0	NiCl ₂	$5,25 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,0	0,107
1,5	NiCl ₂	$8,5 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,7	0,235
2,0	NiCl ₂	$9,75 \cdot 10^{-5}$	$5,26 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,4	0,283
2,5	NiCl ₂	$1,38 \cdot 10^{-4}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,8	0,327
3,0	NiCl ₂	$1,55 \cdot 10^{-4}$	$7,89 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,1	0,386

Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass die bivalenten Kationen alle ähnlich mit der Hyaluronsäure wechselwirken. Ein zweiwertiges Kation wechselwirkt im Durchschnitt mit 5,00 Monomereinheiten der Hyaluronsäure. Dagegen wird bei dem verwendeten dreiwertigen Kation (Cr^{3+}) ein durchschnittliches Verhältnis von 1 / 6,13 nachgewiesen. Mit Hilfe der entwickelten Anpassungsfunktion werden nahezu identische Äquivalenzpunkte und somit auch Monomereinheitenverhältnisse berechnet. Auftragungen von Gegenüberstellungen für berechnete Leitfähigkeitsfunktionen mit gemessenen sind im Anhang dargestellt.

5.1.3 Leitfähigkeitsmessung von Xanthan

Die konduktometrischen Messungen mit Xanthanlösungen (0,5 mg/mL – 3,0 mg/mL) zeigen, dass zwischen Xanthan und den verschiedenen Kationen (Ba^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} und Ni^{2+}) ebenfalls Wechselwirkungen auftreten. Die aufgenommen Graphen weisen auch hier einen diskontinuierlichen Verlauf auf. Dies ist auch deutlich in der exemplarischen Abbildung 5.5 zu erkennen. Weitere Auftragungen der Leitfähigkeitsmessungen der konduktometrischen Titrationen mit Xanthan sind im Anhang dargestellt.

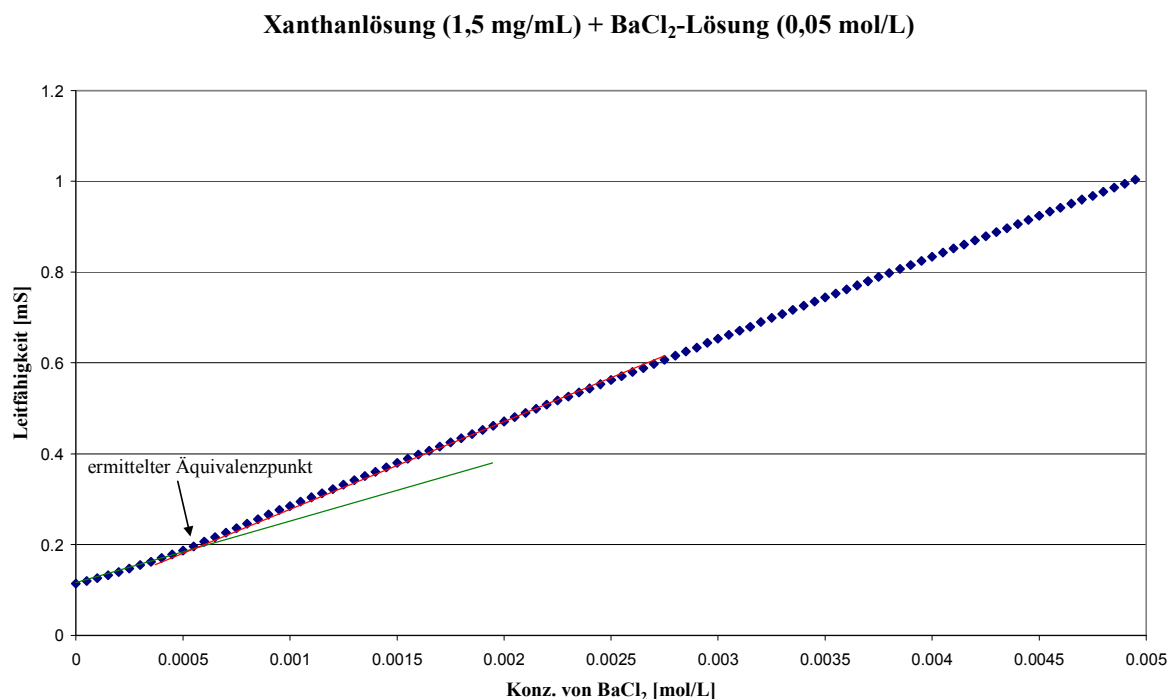


Abbildung 5.5: Exemplarische Abbildung der konduktometrischen Titration von Xanthan unter Zugabe von BaCl_2 -Lösung.

Betrachtet man den Verlauf der konduktometrischen Titration von Xanthanlösungen (z.B. Abb. 5.5) so ist deutlich zu erkennen, dass die Leitfähigkeitsfunktion dem Ergebnis der Messung mit Hyaluronsäurelösung sehr ähnelt. Auch hier ist der Anstieg der Leitfähigkeit bis zum Äquivalenzpunkt erst gering; erst nach Überschreiten des Äquivalenzpunktes ist ein starker Anstieg der Leitfähigkeit sichtbar. Eine Abnahme des stärkeren Anstiegs der Leitfähigkeit resultiert erst bei höheren Elektrolytkonzentrationen durch das Kohlrausch'sche Quadratwurzel-Gesetz.

Auch die Auftragungen des ersten Differentials der Leitfähigkeitsfunktion ähneln denen bei der Hyaluronsäure, denn bei den Auftragungen für die Xanthanlösungen bleibt das erste Differential der Leitfähigkeit im Anschluss an den Äquivalenzpunkt auch nahezu konstant,

bzw. nimmt leicht ab. Eine exemplarische Auftragung für Xanthanlösungen ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

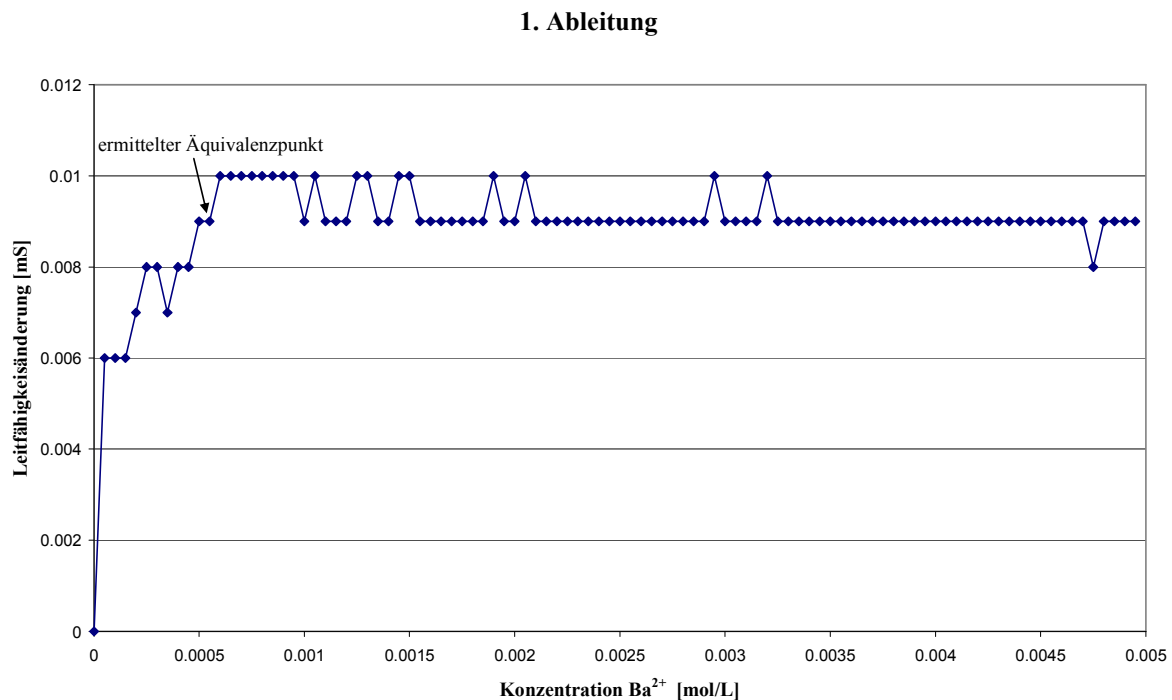


Abbildung 5.6: Ableitung der konduktometrischen Titration aus Abbildung 5.5.

Vergleicht man die einzelnen Leitfähigkeitsgraphen für Xanthanlösungen miteinander, so sind auch hier wieder Variationen in Abhängigkeit von den jeweiligen Kationen zu erkennen. So treten oberhalb des Äquivalenzpunktes unterschiedliche Steigungen auf, welche von den molaren Leitfähigkeiten der entsprechenden Kationen abhängen. Die Diskontinuitäten, die im Bereich der Äquivalenzkonzentration auftreten, stellen auch bei den Xanthanlösungen ein charakteristisches Merkmal für die Stabilität des sich zwischen dem Xanthan und dem jeweiligen Schwermetallkationen einstellenden Komplexes dar. So wird hier ebenfalls wieder die Differenz ($\Delta\kappa^*$) bestimmt. Die sich für die jeweiligen Messungen ergebenden $\Delta\kappa^*$ -Werte sind in Tabelle 5.4 dargestellt.

Aus den verschiedenen Graphen der einzelnen Messungen lassen sich ebenso die Konzentrationen des jeweiligen Elektrolyten an dem entsprechenden Äquivalenzpunkt ablesen. Diese Äquivalenzkonzentrationen ($c_{\bar{A}}$) für alle verschiedenen Xanthanlösungen sind in Tabelle 5.3 gezeigt. Unter zu Hilfenahme der Stoffmenge des entsprechenden Schwermetallsalzes am Äquivalenzpunkt (n_K), welche auch in Tabelle 5.3 dargestellt sind und den Stoffmengen für eine Monomereinheit (n_{MP}) des Xanthans, welche man über Gleichung (4-2) mit einem M_{MP} von 937 g/mol erhält, wird nun das stöchiometrische Verhältnis ($Q_{K/MP}$)

zwischen den Schwermetallkationen und einer Monomereinheit des Xanthans berechnet. Diese errechneten Werte sind, ebenso wie die $\Delta\kappa^*$ -Werte, in Tabelle 5.4 angegeben.

Tabelle 5.3: Mittelwerte der Äquivalenzkonzentration $c_{\bar{A}}$ und der Stoffmenge n_K der Messungen von Xanthanlösungen mit 0,05 mol/L der jeweils verwendeten Metallsalzlösung.

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	$c_{\bar{A}}$ [mol/L]	n_K [mol]
0,5	BaCl ₂	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$
1,0	BaCl ₂	$4,25 \cdot 10^{-4}$	$4,25 \cdot 10^{-5}$
1,5	BaCl ₂	$6,75 \cdot 10^{-4}$	$6,75 \cdot 10^{-5}$
2,0	BaCl ₂	$9,75 \cdot 10^{-4}$	$9,75 \cdot 10^{-5}$
2,5	BaCl ₂	$9,5 \cdot 10^{-4}$	$9,5 \cdot 10^{-5}$
3,0	BaCl ₂	-	-
0,5	CrCl ₃	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$
1,0	CrCl ₃	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	CrCl ₃	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$
2,0	CrCl ₃	$7 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-5}$
2,5	CrCl ₃	$8,25 \cdot 10^{-4}$	$8,25 \cdot 10^{-5}$
3,0	CrCl ₃	$8,75 \cdot 10^{-4}$	$8,75 \cdot 10^{-5}$
0,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
1,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$
1,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$7,3 \cdot 10^{-4}$	$7,3 \cdot 10^{-5}$
2,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1,02 \cdot 10^{-3}$	$1,02 \cdot 10^{-4}$
2,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1,25 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$
3,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	$c_{\bar{A}}$ [mol/L]	n_K [mol]
0,5	CuCl ₂	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-5}$
1,0	CuCl ₂	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	CuCl ₂	$7 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-5}$
2,0	CuCl ₂	$9,5 \cdot 10^{-4}$	$9,5 \cdot 10^{-5}$
2,5	CuCl ₂	-	-
3,0	CuCl ₂	-	-
0,5	FeCl ₂	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-5}$
1,0	FeCl ₂	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	FeCl ₂	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$
2,0	FeCl ₂	$9 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-5}$
2,5	FeCl ₂	-	-
3,0	FeCl ₂	-	-
0,5	NiCl ₂	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$
1,0	NiCl ₂	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$
1,5	NiCl ₂	$6,75 \cdot 10^{-4}$	$6,75 \cdot 10^{-5}$
2,0	NiCl ₂	$8 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-5}$
2,5	NiCl ₂	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
3,0	NiCl ₂	-	-

Tabelle 5.4: Mittelwerte des stöchiometrischen Verhältnisses ($Q_{K/MP}$) und der $\Delta\kappa^*$ -Werte von den verwendeten Kationen bei der konduktometrischen Titration mit Xanthan.

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	n_K [mol]	n_{MP} [mol]	$Q_{K/MP}$	$\Delta\kappa^*$ [mS/cm]
0,5	BaCl ₂	$2 \cdot 10^{-5}$	$5,34 \cdot 10^{-5}$	1 / 2,7	0,019
1,0	BaCl ₂	$4,25 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,5	0,032
1,5	BaCl ₂	$6,75 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,4	0,044
2,0	BaCl ₂	$9,75 \cdot 10^{-5}$	$2,13 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,2	0,066
2,5	BaCl ₂	$9,5 \cdot 10^{-5}$	$2,67 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,8	0,079
3,0	BaCl ₂	-	-	-	-

c _p [mg/mL]	Elektrolyt	n _K [mol]	n _{MP} [mol]	Q _{K/MP}	Δκ* [mS/cm]
0,5	CrCl ₃	2*10 ⁻⁵	5,34*10 ⁻⁵	1 / 2,7	0,047
1,0	CrCl ₃	3,5*10 ⁻⁵	1,07*10 ⁻⁴	1 / 3,1	0,081
1,5	CrCl ₃	5*10 ⁻⁵	1,6*10 ⁻⁴	1 / 3,2	0,107
2,0	CrCl ₃	7*10 ⁻⁵	2,13*10 ⁻⁴	1 / 3,0	0,136
2,5	CrCl ₃	8,25*10 ⁻⁵	2,67*10 ⁻⁴	1 / 3,2	0,156
3,0	CrCl ₃	8,75*10 ⁻⁵	3,2*10 ⁻⁴	1 / 3,7	0,177
0,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	2,5*10 ⁻⁵	5,34*10 ⁻⁵	1 / 2,1	0,028
1,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	5*10 ⁻⁵	1,07*10 ⁻⁴	1 / 2,1	0,048
1,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	7,3*10 ⁻⁵	1,6*10 ⁻⁴	1 / 2,2	0,066
2,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	1,02*10 ⁻⁴	2,13*10 ⁻⁴	1 / 2,1	0,087
2,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	1,25*10 ⁻⁴	2,67*10 ⁻⁴	1 / 2,1	0,104
3,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	1,5*10 ⁻⁴	3,2*10 ⁻⁴	1 / 2,1	0,120
0,5	CuCl ₂	3*10 ⁻⁵	5,34*10 ⁻⁵	1 / 1,8	0,025
1,0	CuCl ₂	5,5*10 ⁻⁵	1,07*10 ⁻⁴	1 / 2,0	0,043
1,5	CuCl ₂	7*10 ⁻⁵	1,6*10 ⁻⁴	1 / 2,3	0,064
2,0	CuCl ₂	9,5*10 ⁻⁵	2,13*10 ⁻⁴	1 / 2,2	0,083
2,5	CuCl ₂	-	-	-	-
3,0	CuCl ₂	-	-	-	-
0,5	FeCl ₂	3*10 ⁻⁵	5,34*10 ⁻⁵	1 / 1,8	0,021
1,0	FeCl ₂	5,5*10 ⁻⁵	1,07*10 ⁻⁴	1 / 2,0	0,034
1,5	FeCl ₂	7,5*10 ⁻⁵	1,6*10 ⁻⁴	1 / 2,1	0,058
2,0	FeCl ₂	9*10 ⁻⁵	2,13*10 ⁻⁴	1 / 2,4	0,064
2,5	FeCl ₂	-	-	-	-
3,0	FeCl ₂	-	-	-	-
0,5	NiCl ₂	2*10 ⁻⁵	5,34*10 ⁻⁵	1 / 2,7	0,028
1,0	NiCl ₂	4*10 ⁻⁵	1,07*10 ⁻⁴	1 / 2,7	0,060
1,5	NiCl ₂	6,75*10 ⁻⁵	1,6*10 ⁻⁴	1 / 2,4	0,071
2,0	NiCl ₂	8*10 ⁻⁵	2,13*10 ⁻⁴	1 / 2,4	0,100
2,5	NiCl ₂	1*10 ⁻⁴	2,67*10 ⁻⁴	1 / 2,1	0,129
3,0	NiCl ₂	-	-	-	-

Die in dieser Tabelle dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen zweiwertigen Kationen mit Xanthan ähnlich wechselwirken wie mit der der Hyaluronsäure, wobei jedoch andere Mengenverhältnisse vorliegen. Im Mittel geht eines der verschiedenen zweiwertigen Kationen mit 2,26 Monomereinheiten des Xanthans Wechselwirkungen ein. Das dreiwertige Kation (Cr^{3+}) unterscheidet sich auch hier wieder von den zweiwertigen Kationen, denn es weist ein durchschnittliches Kation / Monomerverhältnis von 1 / 3,15 auf. Die entwickelte Anpassungsfunktion bestätigt auch hier diese Ergebnisse. Gegenüberstellungen der berechneten sowie der gemessenen Leitfähigkeitsfunktion sind im Anhang gezeigt.

5.2 Rotationsviskosimetrie

5.2.1 Viskositätsmessungen von Dextran

Die rotationsviskosimetrischen Messungen werden wie in Kapitel 4.3 beschrieben durchgeführt und belegen für die verwendeten Dextranlösungen, dass keine Wechselwirkungen zwischen Dextran und den verwendeten Kationen auftreten. Dies wird daran deutlich, dass bei allen Messungen keine Änderung der Viskosität auftritt, d.h. diese bleibt über den ganzen Zeitraum der Messungen konstant, wie es auch in Abbildung 5.7 gezeigt wird. Dies stellt eine Bestätigung der Ergebnisse der Konduktometrie dar.

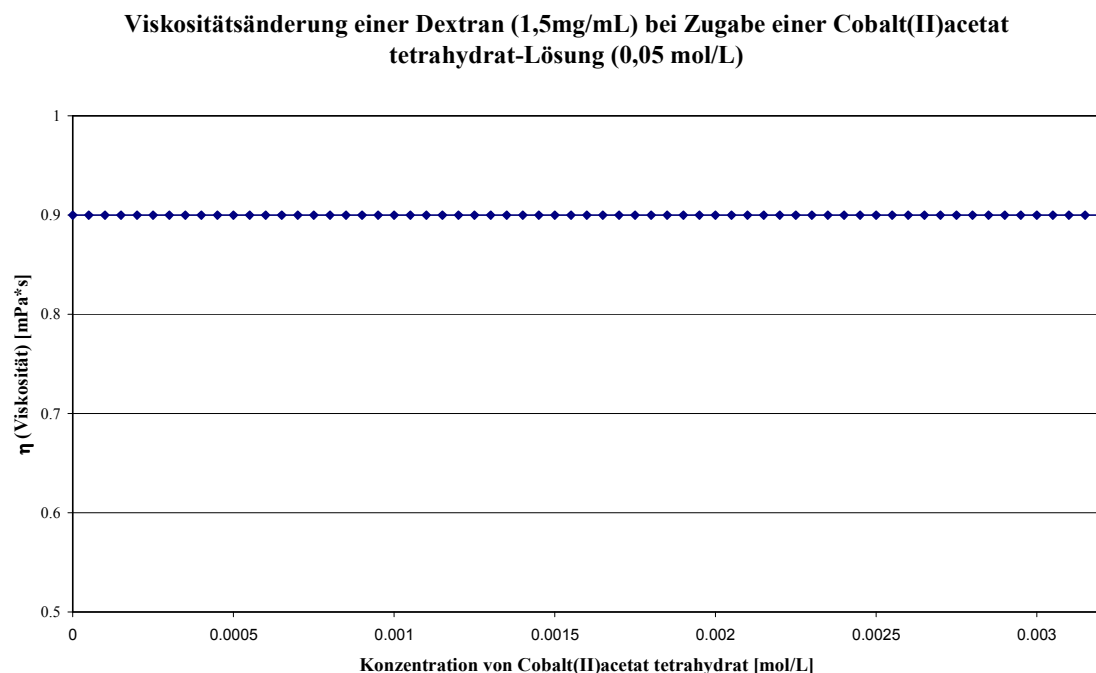


Abbildung 5.7: Beispiel für die Ergebnisse der rotationsviskosimetrischen Messungen von Dextran.

Wie deutlich aus der dargestellten Titrationskurve zu erkennen ist, weisen die Titrationskurven beim Dextran einen linearen Verlauf auf. Es kann zu einer leichten Varianz der Messwerte kommen, welche aber in der versuchsbedingten Toleranz liegt. Vergleicht man diesen hier gezeigten Graphen mit den anderen Viskositätskurven, welche im Anhang abgebildet sind, ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe der verschiedenen verwendeten Kationen keinen Einfluss auf die Viskosität hat. Die in dieser Arbeit bestimmten Viskositäten der Dextranlösungen sind bei allen durchgeführten Messungen nahezu konstant.

5.2.2 Viskositätsmessungen von Hyaluronsäure

Die rotationsviskosimetrische Titration mit Hyaluronsäurelösungen wird wie in Abschnitt 4.3 beschrieben vollzogen. Dass zwischen der Hyaluronsäure und den einzelnen Kationen (Ba^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} und Ni^{2+}) Wechselwirkungen auftreten, wie es auch schon mit der konduktometrischen Titration nachgewiesen wurde, ist daran zu erkennen, dass hier der Verlauf der Viskositätsfunktion von dem Verlauf einer Geraden, wie er bei Dextran auftritt, abweicht und eine kontinuierliche Abnahme zu erkennen ist. Diese Abnahme der Viskosität wird im Verlauf des Graphen immer geringer, bis die Viskosität einen konstanten Wert erreicht. Dieser hier beschriebene Verlauf ist charakteristisch für alle in dieser Arbeit untersuchten Schwermetallkationen. Bei den Messungen mit den einzelnen Kationen kann für jede Messung der Äquivalenzpunkt ermittelt werden. Dies erfolgt mittels graphischer Extrapolation. Dazu werden Geraden an die Viskositätsgraphen angelegt. Unter Zuhilfenahme der aus dem Graphen ablesbaren Äquivalenzkonzentration des jeweiligen Metallkations (c_A) kann schon, wie bei den Leitfähigkeitsmessungen, das stöchiometrische Verhältnis zwischen dem verwendeten Kation und den Monomereinheiten der Hyaluronsäure bestimmt werden. Eine exemplarische Darstellung einer Viskositätsmessung ist in Abbildung 5.8 gezeigt. Weiteren Graphen, zu den in dieser Arbeit durchgeführten rotationsviskosimetrischen Messungen, sind im Anhang dargestellt.

Viskositätsänderung einer Hyaluronsäurelösung (1,5 mg/mL) bei der Zugabe einer NiCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

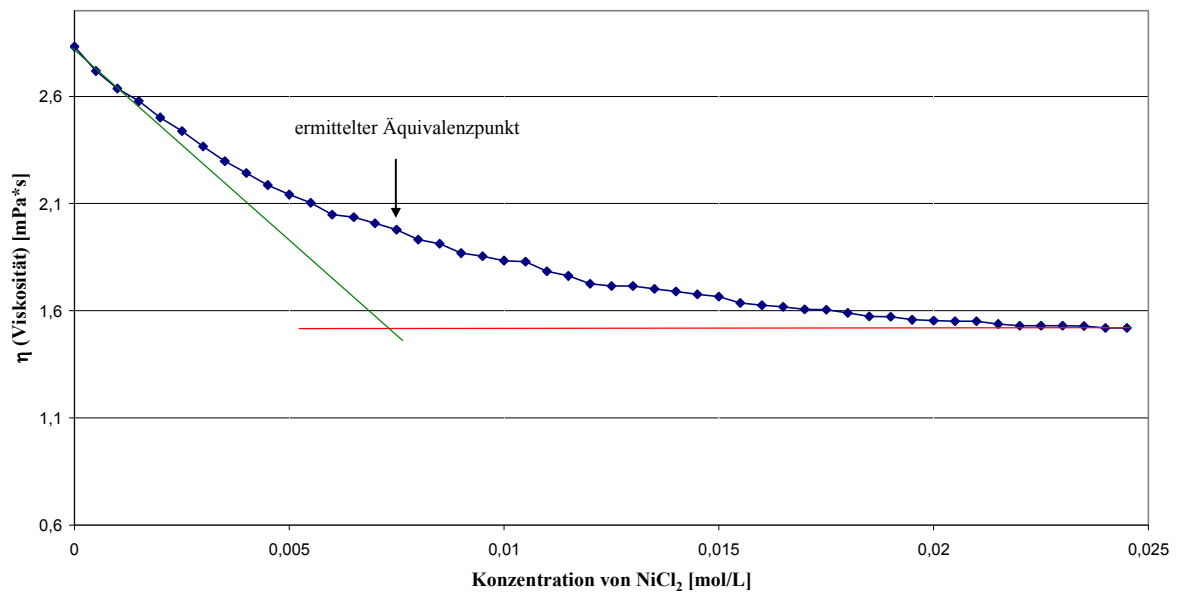


Abbildung 5.8: Ergebnisbeispiel für die rotationsviskosimetrischen Messungen mit Hyaluronsäurelösungen.

Die sich aus den jeweiligen Messungen ergebenden Äquivalenzkonzentrationen des jeweiligen Metallkations ($c_{\bar{A}}$) und die dazugehörigen Stoffmengen (n_K) sind in der folgenden Tabelle (5.5) gezeigt.

Tabelle 5.5: Mittelwert der Äquivalenzkonzentration ($c_{\bar{A}}$) und der Stoffmenge (n_K) der Messungen von Hyaluronsäurelösungen mit den verwendeten Metallsalzlösungen für die rotationsviskosimetrischen Messungen.

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	$c_{\bar{A}}$ [mol/L]	n_K [mol]
0,5	BaCl_2	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
1,0	BaCl_2	$5,75 \cdot 10^{-4}$	$5,75 \cdot 10^{-5}$
1,5	BaCl_2	$8,25 \cdot 10^{-4}$	$8,25 \cdot 10^{-5}$
2,0	BaCl_2	$10,75 \cdot 10^{-4}$	$10,75 \cdot 10^{-5}$
2,5	BaCl_2	$11,75 \cdot 10^{-4}$	$11,75 \cdot 10^{-5}$
0,5	CrCl_3	-	-
1,0	CrCl_3	$4,17 \cdot 10^{-4}$	$4,17 \cdot 10^{-5}$
1,5	CrCl_3	$6,5 \cdot 10^{-4}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$
2,0	CrCl_3	-	-
2,5	CrCl_3	-	-

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	$c_{\ddot{A}}$ [mol/L]	n_K [mol]
0,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-
1,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$5,34 \cdot 10^{-4}$	$5,34 \cdot 10^{-5}$
1,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$7,17 \cdot 10^{-4}$	$7,17 \cdot 10^{-5}$
2,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-
2,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-
0,5	CuCl ₂	-	-
1,0	CuCl ₂	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	CuCl ₂	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
2,0	CuCl ₂	-	-
2,5	CuCl ₂	-	-
0,5	FeCl ₂	-	-
1,0	FeCl ₂	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	FeCl ₂	-	-
2,0	FeCl ₂	-	-
2,5	FeCl ₂	-	-
0,5	NiCl ₂	$3,25 \cdot 10^{-4}$	$3,25 \cdot 10^{-5}$
1,0	NiCl ₂	$6,25 \cdot 10^{-4}$	$6,25 \cdot 10^{-5}$
1,5	NiCl ₂	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$
2,0	NiCl ₂	$12,25 \cdot 10^{-4}$	$12,25 \cdot 10^{-5}$
2,5	NiCl ₂	$12,5 \cdot 10^{-4}$	$12,5 \cdot 10^{-5}$

Die Stoffmenge einer Monomereinheit (n_{MP}) der Hyaluronsäurelösung erhält man unter Zuhilfenahme der bekannten molaren Masse einer Monomereinheit (M_{MP}) der Hyaluronsäure, wie schon bei den Ergebnissen der konduktometrischen Titration beschrieben.

Aus der Stoffmenge (n_{MP}) der Hyaluronsäure und der Stoffmenge ($n_{\ddot{A}}$) der Kationen am Äquivalenzpunkt wird das Verhältnis von Monomereinheit zu Kation ($Q_{K/MP}$), wie in Kapitel 4.2 beschrieben, bestimmt. Diese Verhältnisse sind in der folgenden Tabelle 5.6 dargestellt.

Tabelle 5.6: Mittelwerte des stöchiometrischen Verhältnisses ($Q_{K/MP}$) für die verwendeten Kationen bei den Viskositätsmessungen mit Hyaluronsäure.

c_P [mg/mL]	Elektrolyt	n_K [mol]	n_{MP} [mol]	$Q_{K/MP}$
0,5	BaCl ₂	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,8
1,0	BaCl ₂	$5,75 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,6
1,5	BaCl ₂	$8,25 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,8
2,0	BaCl ₂	$10,75 \cdot 10^{-5}$	$5,26 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,9
2,5	BaCl ₂	$11,75 \cdot 10^{-5}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,6
0,5	CrCl ₃	-	-	-
1,0	CrCl ₃	$4,17 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 6,3
1,5	CrCl ₃	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 6,1
2,0	CrCl ₃	-	-	-
2,5	CrCl ₃	-	-	-
0,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-	-
1,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$5,34 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,9
1,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$7,17 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,5
2,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-	-
2,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-	-
0,5	CuCl ₂	-	-	-
1,0	CuCl ₂	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,8
1,5	CuCl ₂	$1 \cdot 10^{-4}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,95
2,0	CuCl ₂	-	-	-
2,5	CuCl ₂	-	-	-
0,5	FeCl ₂	-	-	-
1,0	FeCl ₂	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,8
1,5	FeCl ₂	-	-	-
2,0	FeCl ₂	-	-	-
2,5	FeCl ₂	-	-	-

c_P [mg/ml]	Elektrolyt	n_K [mol]	n_{MP} [mol]	$Q_{K/MP}$
0,5	NiCl ₂	$3,25 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,1
1,0	NiCl ₂	$6,25 \cdot 10^{-5}$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,2
1,5	NiCl ₂	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3
2,0	NiCl ₂	$12,25 \cdot 10^{-5}$	$5,26 \cdot 10^{-4}$	1 / 4,3
2,5	NiCl ₂	$12,5 \cdot 10^{-5}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	1 / 5,3

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die bivalenten Kationen nahezu gleiche Wechselwirkungen mit der Hyaluronsäure eingehen. Denn das durchschnittliche Kation-Monomer-Verhältnis liegt für die verwendeten bivalenten Kationen bei 1 / 4,86. Das mittlere Kation-Monomer-Verhältnis für die rotationsviskosimetrischen Messungen mit Cr^{3+} -Kationen und Hyaluronsäure ist 1 / 6,2.

Um eine Aussage über die Viskosität der Hyaluronsäurelösungen über einen längeren Zeitraum machen zu können, wird für jedes Kation eine Langzeitmessung über den Zeitraum von zwei Wochen bei einer konstanten Metallkonzentration (0,0075 mol/L) des jeweiligen Kations, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, durchgeführt. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tabelle 5.7: Ergebnisse der Langzeitmessungen der Viskosität von Hyaluronsäurelösungen mit einer konstanten Metallkonzentration.

Zeitraum (h bzw. d)	BaCl ₂	CrCl ₃	CoC ₄ H ₆ O ₆	CuCl ₂	FeCl ₂	NiCl ₂
1 h	1,27	1,10	1,52	1,02	1,06	1,20
2 h	1,30	1,10	1,53	1,02	1,07	1,19
4 h	1,25	1,10	1,51	1,04	1,06	1,18
6 h	1,28	1,12	1,55	1,02	1,08	1,17
1 d	1,28	1,09	1,52	1,06	1,08	1,23
2 d	1,26	1,08	1,54	1,10	1,06	1,20
7 d	1,27	1,11	1,50	1,12	1,10	1,21
10 d	1,27	1,10	1,56	1,10	1,02	1,18
14 d	1,25	1,07	1,51	1,10	1,10	1,22

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Viskosität der vermessenen Hyaluronsäurelösungen auch über einen längeren Zeitraum konstant bleibt.

5.2.3 Viskositätsmessungen von Xanthan

Ebenso wie beim Hyaluronat zeigen die rotationsviskosimetrischen Messungen beim Xanthan, dass zwischen den verschiedenen Kationen (Ba^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} und Ni^{2+}) und dem Xanthan Wechselwirkungen nachgewiesen werden können. Somit bestätigen auch hier die Viskositätsmessungen die Ergebnisse der Konduktometrie. Der Verlauf der einzelnen Viskositätskurven unterscheidet sich für die Messungen mit Xanthan nicht signifikant von denen mit Hyaluronsäure. Auch hier ist zunächst eine kontinuierliche Abnahme der Viskosität zu erkennen, welche immer geringer wird, bis keine signifikanten Änderungen der Viskosität mehr auftreten und der Verlauf des Graphen in einem Plateau mündet. Dies ist deutlich in der Abbildung 5.9 zu erkennen, welche eine exemplarische Abbildung für die Messungen mit Xanthan darstellt. Weitere Ergebnisse dieser Messungen sind im Anhang abgebildet.

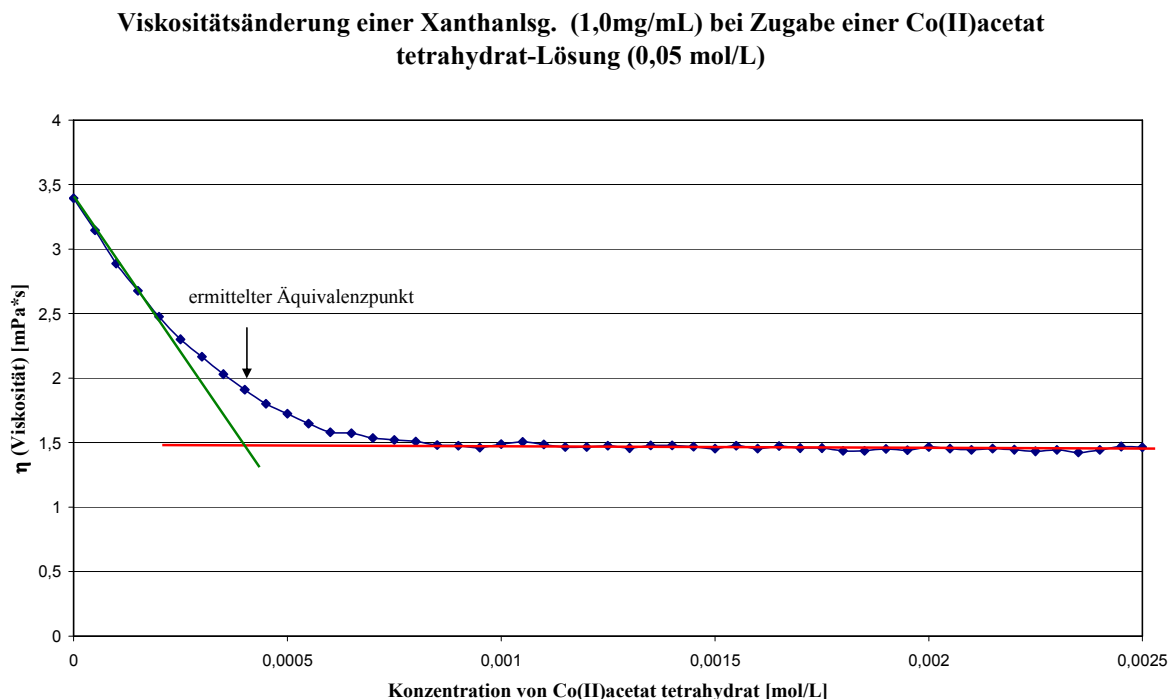


Abbildung 5.9: Abbildungsbeispiel für die rotationsviskosimetrischen Messungen von Xanthanlösungen.

Aus den unterschiedlichen Graphen der verschiedenen Messungen kann die Konzentration des entsprechenden Elektrolyten ($c_{\bar{A}}$) an den Äquivalenzpunkten bestimmt werden. Daraus ergeben sich die Stoffmengen am Äquivalenzpunkt (n_K) für die verschiedenen Elektrolyten. In Tabelle 5.8 sind die Ergebnisse für die Messungen mit den verwendeten Elektrolyten aufgeführt.

Tabelle 5.8: Mittelwerte der Äquivalenzkonzentration ($c_{\bar{A}}$) und der Stoffmenge (n_K) der Messung von Xanthanlösungen mit den verwendeten Metallsalzlösungen für die rotationsviskosimetrischen Messungen.

c_P [mg/ml]	Elektrolyt	$c_{\bar{A}}$ [mol/L]	n_K [mol]
0,5	BaCl ₂	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$
1,0	BaCl ₂	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	BaCl ₂	$6,5 \cdot 10^{-4}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$
2,0	BaCl ₂	$8,25 \cdot 10^{-4}$	$8,25 \cdot 10^{-5}$
2,5	BaCl ₂	$8 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-5}$
0,5	CrCl ₃	-	-
1,0	CrCl ₃	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	CrCl ₃	$5,25 \cdot 10^{-4}$	$5,25 \cdot 10^{-5}$
2,0	CrCl ₃	-	-
2,5	CrCl ₃	-	-
0,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-
1,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$4,7 \cdot 10^{-5}$
1,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	$7 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-4} 7 \cdot 10^{-5}$
2,0	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-
2,5	CoC ₄ H ₆ O ₄	-	-
0,5	CuCl ₂	-	-
1,0	CuCl ₂	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-5}$
1,5	CuCl ₂	-	-
2,0	CuCl ₂	-	-
2,5	CuCl ₂	-	-

c_P [mg/ml]	Elektrolyt	$c_{\bar{A}}$ [mol/L]	n_K [mol]
0,5	FeCl ₂	-	-
1,0	FeCl ₂	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
1,5	FeCl ₂	-	-
2,0	FeCl ₂	-	-
2,5	FeCl ₂	-	-
0,5	NiCl ₂	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$
1,0	NiCl ₂	$4,75 \cdot 10^{-4}$	$4,75 \cdot 10^{-5}$
1,5	NiCl ₂	$5,25 \cdot 10^{-4}$	$5,25 \cdot 10^{-5}$
2,0	NiCl ₂	$7,25 \cdot 10^{-4}$	$7,25 \cdot 10^{-5}$
2,5	NiCl ₂	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$

Da die Stoffmenge einer Monomereinheit (n_{MP}) des Xanthans aus den konduktometrischen Messungen bekannt ist, wird damit wie bei allen anderen Messungen das stöchiometrische Verhältnis ($Q_{K/MP}$) zwischen den eingesetzten Kationen und den Monomereinheiten des Xanthan bestimmt. Diese sind in Tabelle 5.9 aufgeführt.

Tabelle 5.9: Mittelwerte des stöchiometrischen Verhältnisses ($Q_{K/MP}$) für die verwendeten Kationen bei den Viskositätsmessungen mit Xanthan.

c_P [mg/ml]	Elektrolyt	n_K [mol]	n_{MP} [mol]	$Q_{K/MP}$
0,5	BaCl ₂	$2 \cdot 10^{-5}$	$5,34 \cdot 10^{-5}$	1 / 2,7
1,0	BaCl ₂	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,1
1,5	BaCl ₂	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,5
2,0	BaCl ₂	$8,25 \cdot 10^{-5}$	$2,13 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,6
2,5	BaCl ₂	$8 \cdot 10^{-5}$	$2,67 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,3
0,5	CrCl ₃	-	-	-
1,0	CrCl ₃	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,1
1,5	CrCl ₃	$5,25 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,1
2,0	CrCl ₃	-	-	-
2,5	CrCl ₃	-	-	-

c_p [mg/ml]	Elektrolyt	n_K [mol]	n_{MP} [mol]	$Q_{K/MP}$
0,5	$CoC_4H_6O_4$	-	-	-
1,0	$CoC_4H_6O_4$	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,3
1,5	$CoC_4H_6O_4$	$7 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,3
2,0	$CoC_4H_6O_4$	-	-	-
2,5	$CoC_4H_6O_4$	-	-	-
0,5	$CuCl_2$	-	-	-
1,0	$CuCl_2$	$6 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$	1 / 1,8
1,5	$CuCl_2$	-	-	-
2,0	$CuCl_2$	-	-	-
2,5	$CuCl_2$	-	-	-
0,5	$FeCl_2$	-	-	-
1,0	$FeCl_2$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,1
1,5	$FeCl_2$	-	-	-
2,0	$FeCl_2$	-	-	-
2,5	$FeCl_2$	-	-	-
0,5	$NiCl_2$	$2 \cdot 10^{-5}$	$5,34 \cdot 10^{-5}$	1 / 2,7
1,0	$NiCl_2$	$4,75 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,3
1,5	$NiCl_2$	$5,25 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	1 / 3,0
2,0	$NiCl_2$	$7,25 \cdot 10^{-5}$	$2,13 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,9
2,5	$NiCl_2$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2,67 \cdot 10^{-4}$	1 / 2,1

Die hier gezeigten Ergebnisse für die rotationsviskosimetrischen Messungen mit Xanthan bestätigen die Ergebnisse der konduktometrischen Titrations mit Xanthan. Denn auch hier wird in etwa ein Kation-Monomer-Verhältnis von 1 / 2,55 für die Wechselwirkungen zwischen den bivalenten Kationen und dem Xanthan nachgewiesen. Für die Wechselwirkungen zwischen Cr^{3+} -Kation und Xanthan kann, wie bei der Konduktometrie, ein Verhältnis von 1 / 3,1 bestätigt werden.

Auch für die Viskosität von Xanthanlösungen wurde ein Langzeitversuch mit einer Konzentration der Kationen von 0,0075 mol/L, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5.10 dargestellt.

Tabelle 5.10: Ergebnisse der Langzeitmessung der Viskosität von Xanthanlösungen mit einer konstanten Elektrolytkonzentration.

Zeitraum (h bzw. d)	BaCl ₂	CrCl ₃	CoC ₄ H ₆ O ₆	CuCl ₂	FeCl ₂	NiCl ₂
1 h	1,35	1,73	1,81	1,32	1,32	1,33
2 h	1,35	1,70	1,80	1,30	1,30	1,32
4 h	1,37	1,76	1,80	1,30	1,32	1,32
6 h	1,36	1,75	1,79	1,32	1,30	1,32
1 d	1,35	1,72	1,78	1,30	1,30	1,34
2 d	1,38	1,74	1,77	1,26	1,28	1,33
7 d	1,33	1,74	1,82	1,32	1,32	1,33
10 d	1,30	1,73	1,80	1,30	1,30	1,33
14 d	1,34	1,73	1,80	1,30	1,30	1,35

Wie diese Ergebnisse zeigen, bleibt auch die Viskosität von Xanthanlösungen über einen Zeitraum von zwei Wochen nahezu konstant.

5.3 Atomare Kraft-Mikroskopie (AFM)

Um genauer zu betrachten, welche Auswirkungen die nachgewiesenen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Kationen und den einzelnen Polysacchariden auf die Struktur des jeweiligen Polysaccharids haben, wurden Untersuchungen mit der Atomaren Kraft-Mikroskopie (AFM) vorgenommen. Damit sollten Strukturänderungen der verschiedenen Polysaccharidmoleküle abgebildet werden. Im Laufe dieser Arbeit erwies sich dies als sehr schwierig, da sich meist zu viel, bzw. zu wenig des jeweiligen Polysaccharids auf dem Glimmerträger befand und so keine einzelnen Stränge des untersuchten Polysaccharids aufgezeichnet werden konnten. In der folgenden Abbildung 5.10 ist ein Beispiel für eine Mica-Disk ohne jegliches Polysaccharid gezeigt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass sie eine sehr einheitliche Oberfläche mit nur sehr geringen Höhenunterschieden aufweisen.

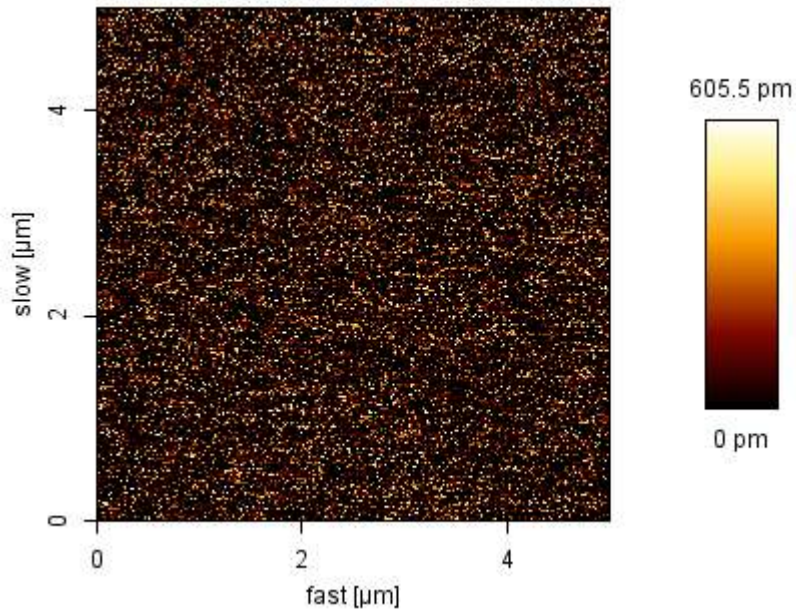


Abbildung 5.10: Oberfläche einer Mica-Disk ohne Polysaccharid

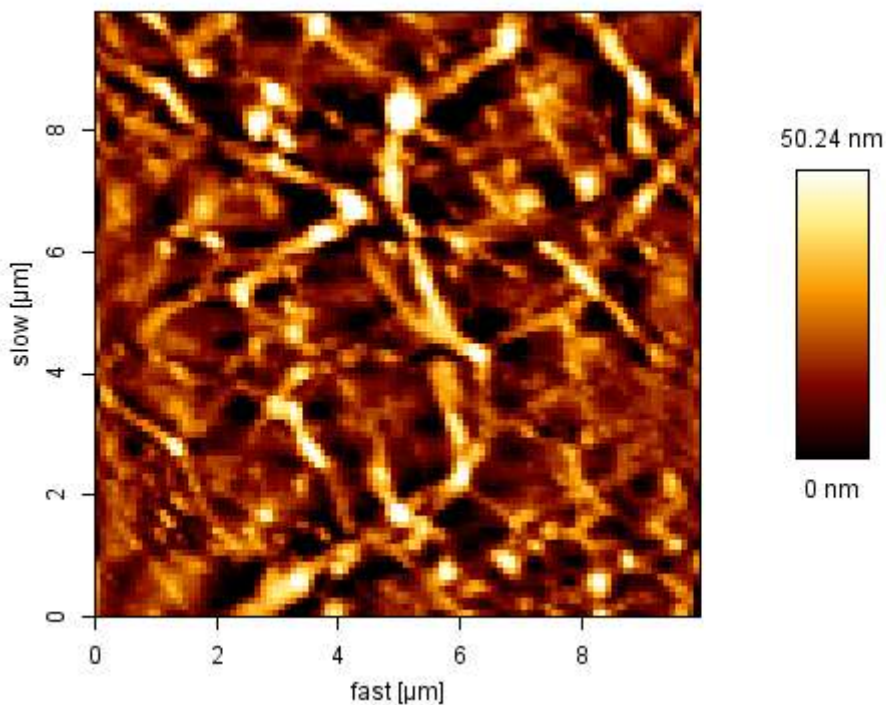


Abbildung 5.11: Mica-Disk mit 1 mg/mL unabgebautem Xanthan beschichtet.

In Abbildung 5.11 ist eine Aufnahme von 1 mg/mL unabgebautem Xanthan dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass es sich dabei um eine zu hohe Xanthankonzentration handelt, denn es liegen viele Xanthanmoleküle in mehreren Schichten übereinander, so dass das hier gezeigte Höhenprofil zustande kommt. Es ist aber die ausgeprägte Netzwerkstruktur in den

verschiedenen Schichten nachzuvollziehen, die die verschiedenen Polysaccharide ausbilden. Trotz dieser Schwierigkeiten konnten Änderungen in der jeweiligen Polysaccharidstruktur nachgewiesen werden.

5.3.1 Charakterisierung von Hyaluronsäure mittels AFM

Bei der Charakterisierung der Hyaluronsäure mittels AFM wird zwischen Messungen mit unabgebauter Hyaluronsäure, mit und ohne Schwermetallkationen, und drei Stunden abgebauten Hyaluronsäure, mit und ohne Kationen, unterschieden.

Zunächst wird sowohl unabgebaute als auch über drei Stunden abgebaute Hyaluronsäure ohne Metallkationen betrachtet. In der folgenden Abbildung 5.12 ist eine Aufnahme von 1,0 mg/mL unabgebauter Hyaluronsäure gezeigt.

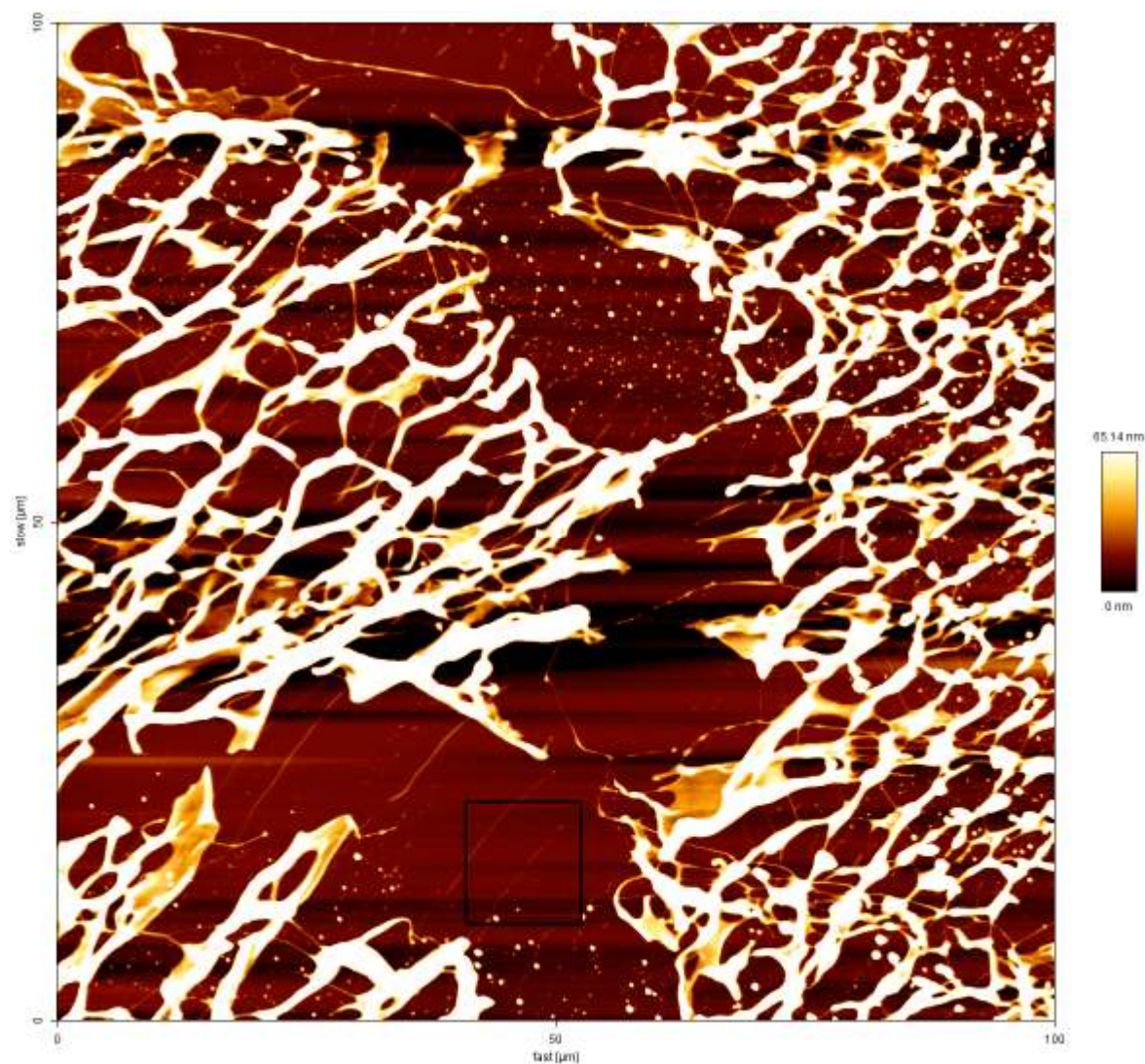


Abbildung 5.12: AFM-Aufnahme von 1 mg/mL unabgebauter Hyaluronsäure.

Auf dieser Abbildung ist deutlich die Netzwerkstruktur zu erkennen, welche die Hyaluronsäure ausbildet. Aus der dazugehörigen Höhenskala ist zu entnehmen, dass die höchsten Stellen des gezeigten Netzwerkes ungefähr 65 nm hoch sind. Diese Höhen kommen dadurch zustande, dass mehrere Hyaluronsäureeinheiten in dem Netzwerk übereinander liegen. Es sind aber zum Teil auch einzelne Hyaluronsäurestränge zu erkennen. Die im unteren Teil der Abbildung, (schwarzer Kasten) zu erkennenden einzelnen Stränge sind in Abbildung 5.13 zusammen mit einer dazugehörigen Höhenmessung vergrößert dargestellt.

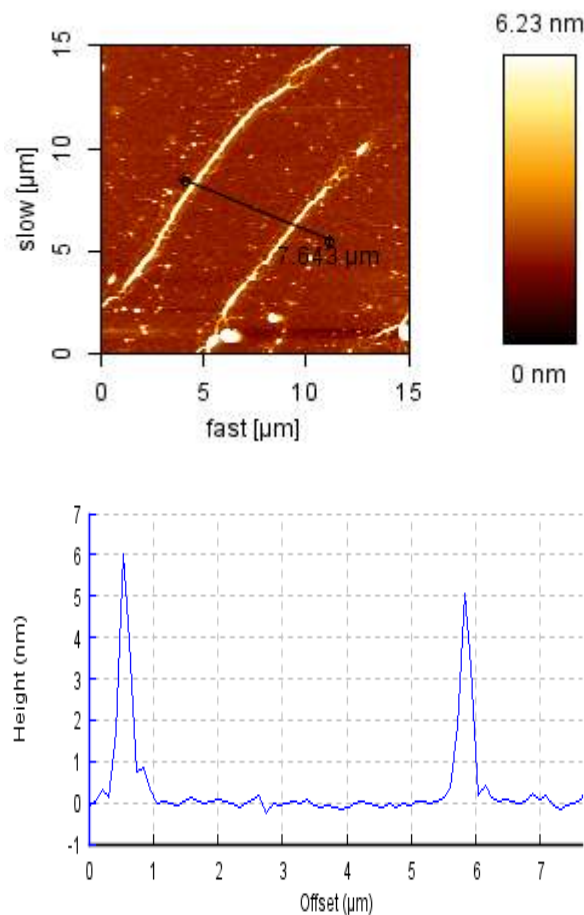


Abbildung 5.13: Vergrößerung aus Abbildung 5.12 mit dazugehöriger Höhenmessung.

Auf dieser Abbildung sind deutlich einzelne Stränge der Hyaluronsäure zu erkennen. Das dazugehörige Höhenprofil weist eine maximale Höhe von 6,23 nm auf. Die dazugehörige Höhenmessung weisen Höhen von 5 bis 6 nm nach.

Die Aufnahmen von 0,25 mg/mL der über drei Stunden abgebauten Hyaluronsäure (Abbildung 5.14) zeigen zwei einzelne dicht aneinander liegende Hyaluronsäureketten. Diese weist ein Höhenprofil mit einer maximalen Höhe von 1,197 nm auf, die dazugehörige Höhenmessung weisen Höhen von 1,0 nm - 1,5 nm nach.

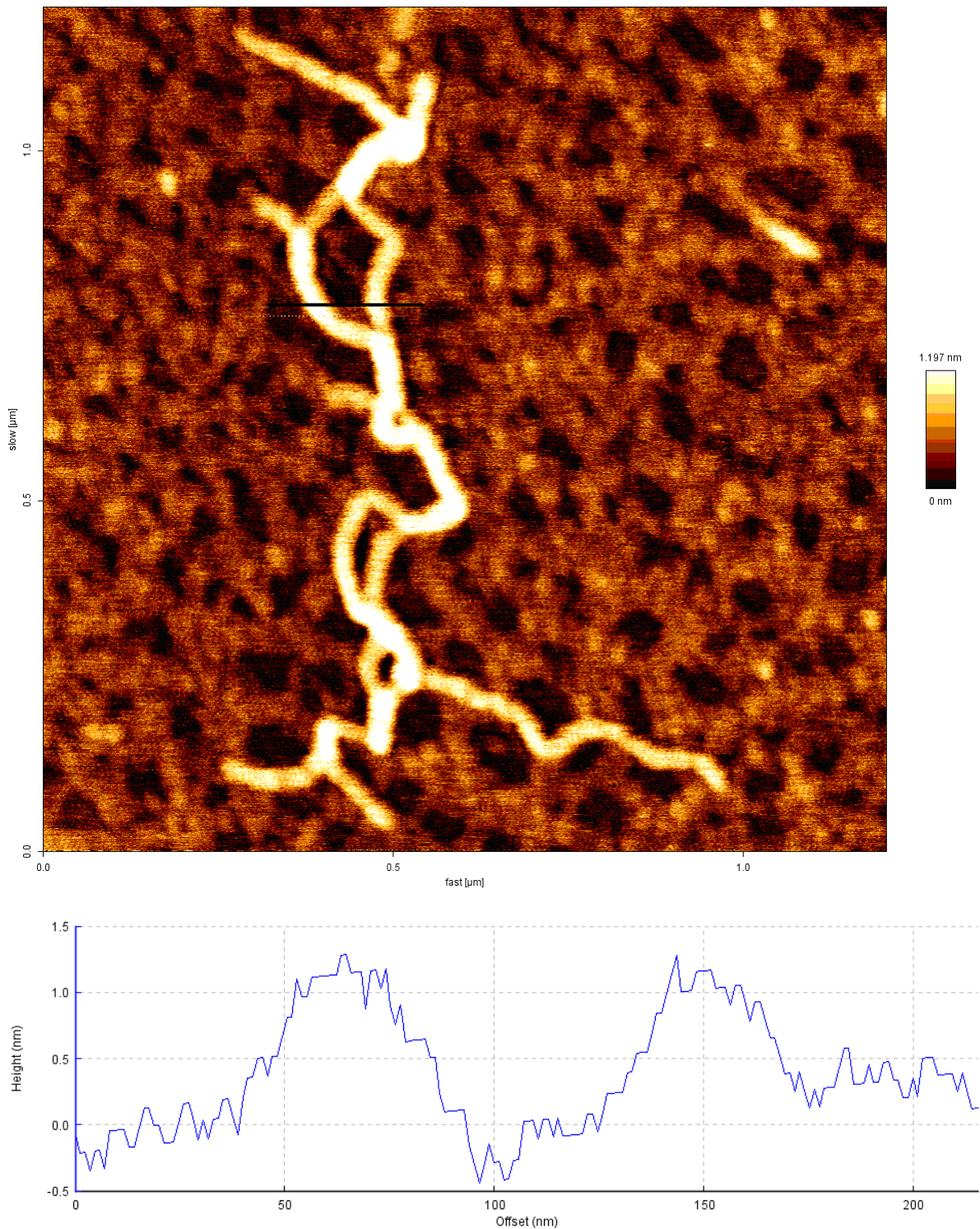


Abbildung 5.14: AFM-Aufnahme von 0,25 mg/mL der über drei Stunden abgebauten Hyaluronsäure und der dazugehörigen Höhenmessung.

Betrachtet man nun die AFM-Aufnahmen von unabgebauter Hyaluronsäure und drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure in Anwesenheit von Schwermetallkationen, so sind Unterschiede zu den Aufnahmen ohne Kationen offensichtlich.

In Abbildung 5.15 ist eine AFM-Aufnahme von 1,0 mg/mL unabgebauter Hyaluronsäure in Anwesenheit von 0,002 mol/L Cu^{2+} -Ionen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass viel mehr und größere Flächen an Hyaluronsäure vorhanden sind, als bei den Aufnahmen ohne Kationen. Dass sich die einzelnen Ketten enger verknäueln können, ist auch dran zu erkennen, dass die einzelnen Hyaluronsäurestränge in dieser Abbildung zum Teil geringere Radien aufweisen und somit dichter aneinander liegen. Der dargestellten Höhenskala ist eine maximale Höhe von 102,4 nm zu entnehmen, welche durch Aufeinanderschichtung der Hyaluronsäureketten zustande kommt.

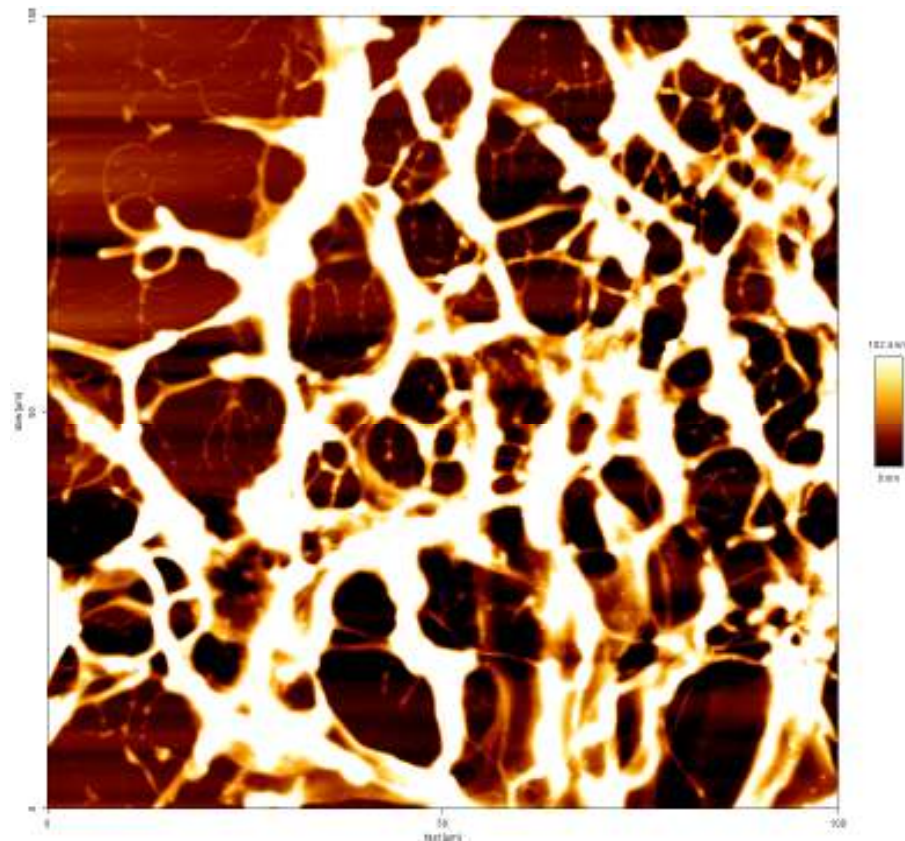


Abbildung 5.15: AFM-Aufnahme von 1,0 mg/mL unabgebauter Hyaluronsäure in Anwesenheit von 0,002 mol/L Cu^{2+} -Kationen.

Auch die Aufnahmen von drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure in Anwesenheit von 0,002 mol/L Kationen (Abbildung 5.16) unterscheiden sich gravierend von denen ohne Kationen. Man erkennt zudem deutlich, dass sich die einzelnen Hyaluronsäureketten verknäueln. Die Effekte treten ohne Anwesenheit von Kationen nicht auf. So wie in Abbildung 5.15 der unabgebauten Hyaluronsäure mit Cu^{2+} -Kationen, weist auch die Abbildung 5.16 der 0,1 mg/mL über drei Stunden abgebauten Hyaluronsäure mit 0,002 mol/L Cu^{2+} -Kationen kleinere Radien der einzelnen Ketten auf.

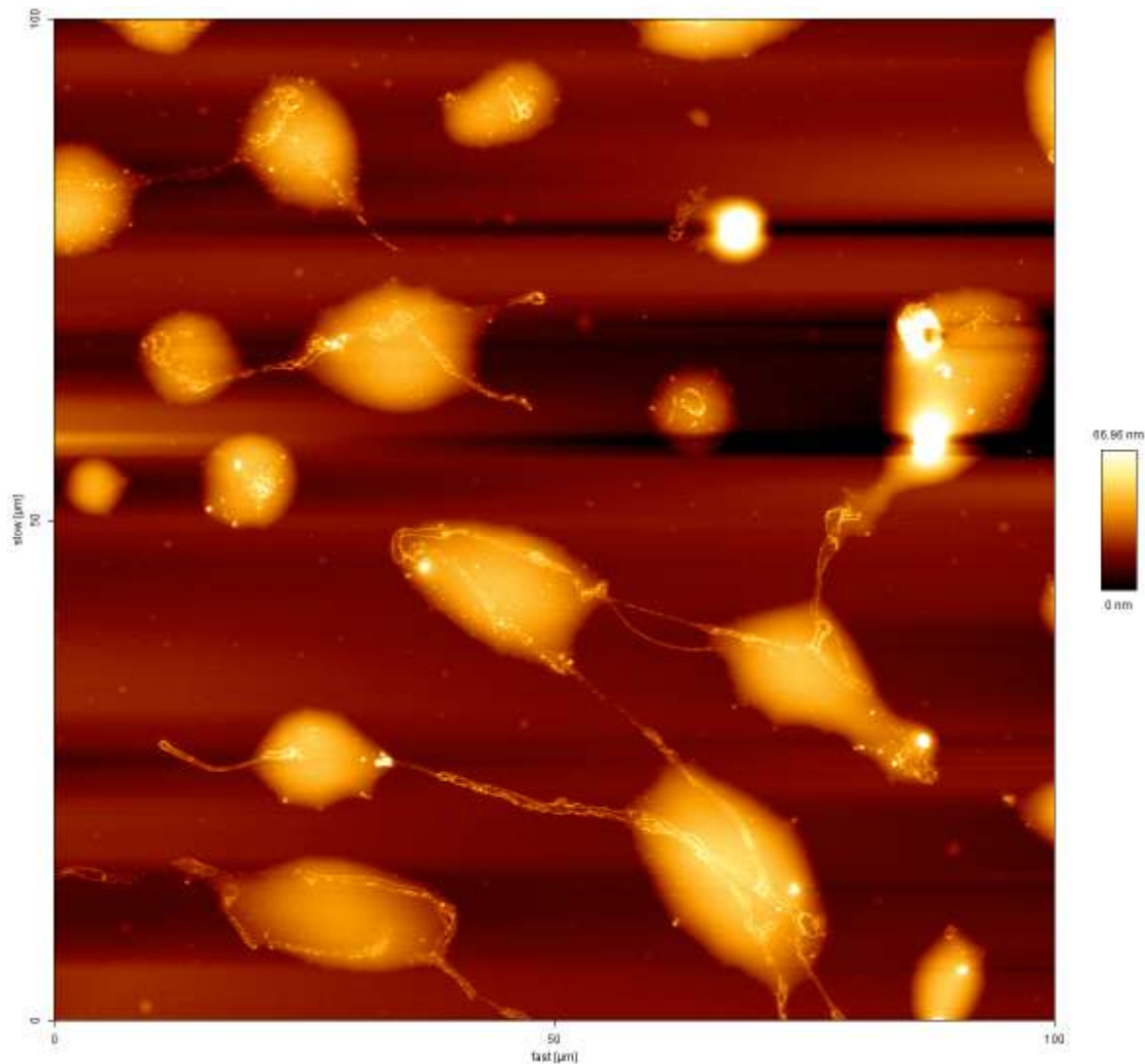


Abbildung 5.16: AFM-Aufnahme von 0,1 mg/mL über drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure in Anwesenheit von 0,002 mol/L Cu^{2+} -Ionen.

5.3.2 Charakterisierung von Xanthan mittels AFM

Bei der Charakterisierung von Xanthan mit Hilfe von AFM-Aufnahmen wurde auch hier generell zwischen unabgebautem Xanthan (mit und ohne Schwermetallkationen) und über drei Stunden abgebautem Xanthan (mit und ohne Schwermetallkationen) unterschieden. Es werden allerdings nur die Aufnahmen von der über drei Stunden abgebautem Xanthan näher betrachtet, da die Aufnahmen von unabgebautem Xanthan sehr schlecht und für eine weitere Analyse unzureichend sind. Dies verdeutlicht auch die oben schon gezeigte Abbildung 5.11, alle anderen Aufnahmen sind sehr ähnlich. Selbst wenn die Konzentration verringert wurde, unterscheiden sich die Aufnahmen nicht gravierend von dieser, sofern Stellen mit Xanthan auf dem Glimmerträger gefunden wurde.

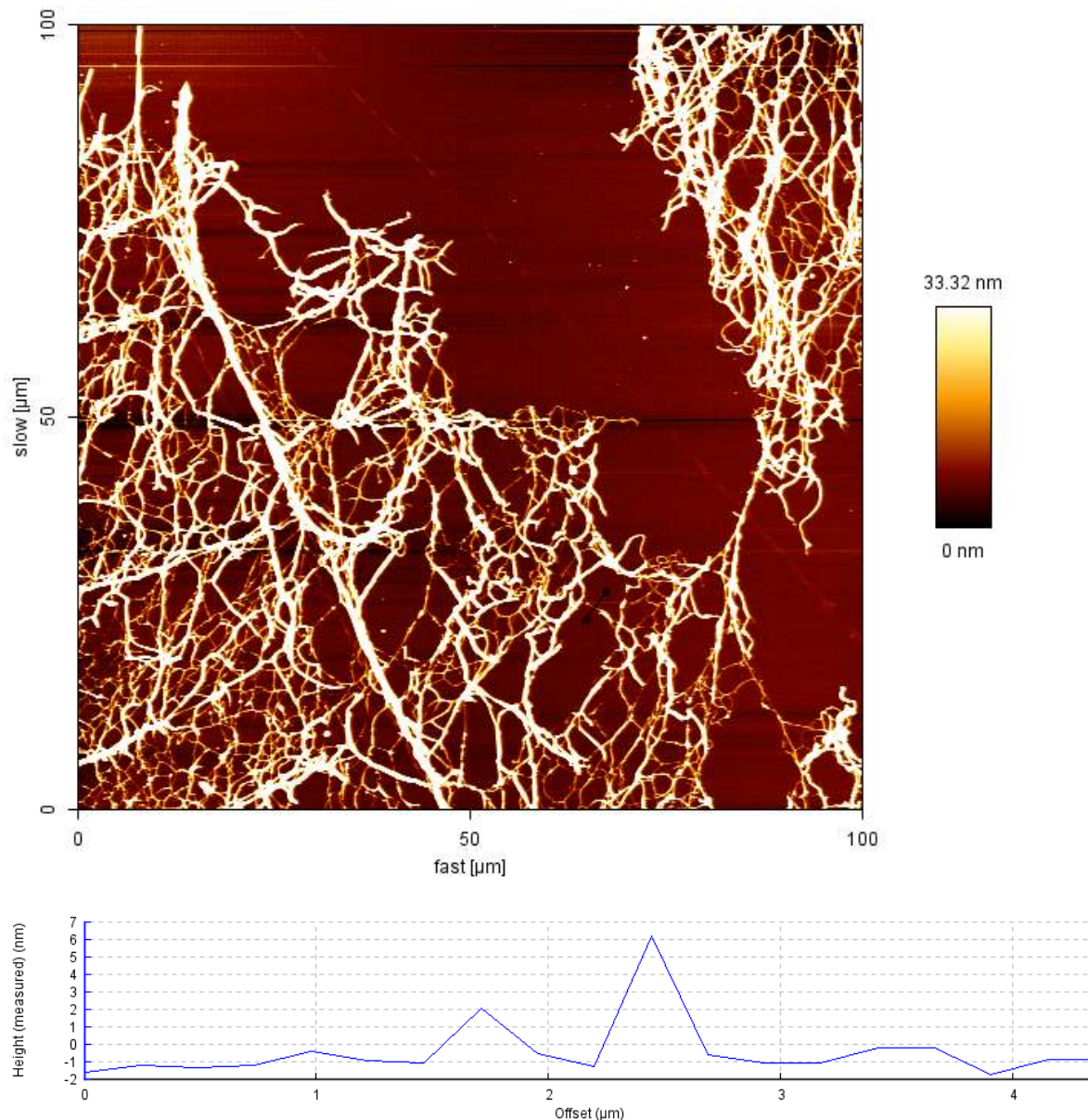


Abbildung 5.17: AFM-Aufnahme von 0,1 mg/mL über drei Stunden abgebautem Xanthan ohne Metallkationen mit dazugehöriger Höhenmessung.

In Abbildung 5.17 ist eine exemplarische AFM-Aufnahme von der 0,1mg/mL über drei Stunden abgebautem Xanthan ohne Schwermetallkationen dargestellt. Auch hier ist deutlich die Netzwerkstruktur zu erkennen, welche Xanthan ebenfalls wie Hyaluronsäure ausbildet. Wie aus der dazugehörigen Höhenskala ersichtlich ist, weist das gebildete Netzwerk Höhen bis zu 33,32 nm auf. Auch hier kommen diese Höhen durch Überlagerungen von verschiedenen Xanthanmolekülen zustande. Es sind aber auch deutlich einzelne Xanthanmoleküle, bzw. Doppelhelices des Xanthans zu erkennen. Dies bestätigt auch die in der Abbildung 5.17 gezeigte Höhenmessung (unten rechts), welche eindeutig Höhen im Bereich von ca. 2 nm bis ca. 6 nm nachweist. Eine Höhe von ca. 2 nm weist deutlich auf einen

einzelnen Molekülstrang des Xanthan hin, wobei eine Höhe von ca. 6 nm signifikant für eine Doppelhelix ist.

Betrachtet man nun im Vergleich dazu, die in der Abbildung 5.18 dargestellte AFM-Aufnahme der von 0,1 mg/mL über drei Stunden abgebautem Xanthan in Anwesenheit von 0,002 mol/L Ba^{2+} -Kationen, so sind deutliche Unterschiede zu erkennen.

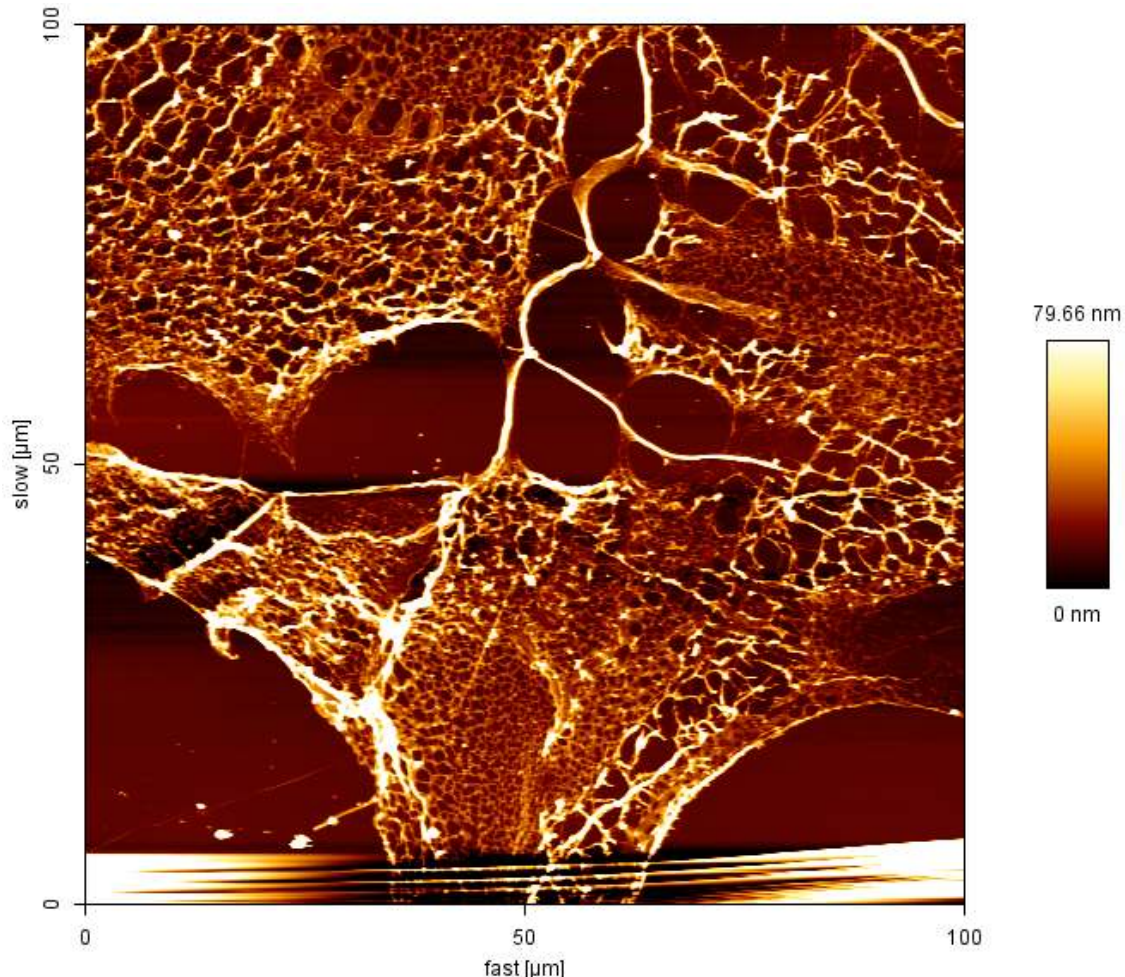


Abbildung 5.18: AFM-Aufnahme der von 0,1 mg/mL über drei Stunden abgebautem Xanthan mit 0,002 mol/L Ba^{2+} -Kationen.

Zunächst ist die zum größten Teil deutlich dichtere Netzwerkstruktur auffallend, welche durch das Verknäueln der einzelnen Xanthaneinheiten zustande kommt. Die in dieser Abbildung gezeigte Höhenskala entspricht aber nicht der Höhenstruktur des abgebildeten Xanthans, da das in dieser Abbildung dargestellte Höhenprofil durch die im unteren Bereich dieser AFM-Aufnahme zu erkennenden Beschädigungen des Glimmerträgers verfälscht ist. Aus diesem Grund wird dieser Bereich der Aufnahme abgeschnitten und der übrige Bereich dieser Aufnahme gesondert in Abbildung 5.19 dargestellt. Diese Abbildung weist nun eine Höhenskala bis zu 64,18 nm auf, welche dem aufgenommenen Höhenprofil des Xanthans entspricht. Eine genaue Höhenmessung einzelner Xanthanstränge ist auf Grund der dichten

Netzwerkstruktur nicht möglich. Wie schon bei der Hyaluronsäure treten auch hier durch die Anwesenheit eines zweiwertigen Kations stärkere Krümmungen der einzelnen Xanthanketten auf.

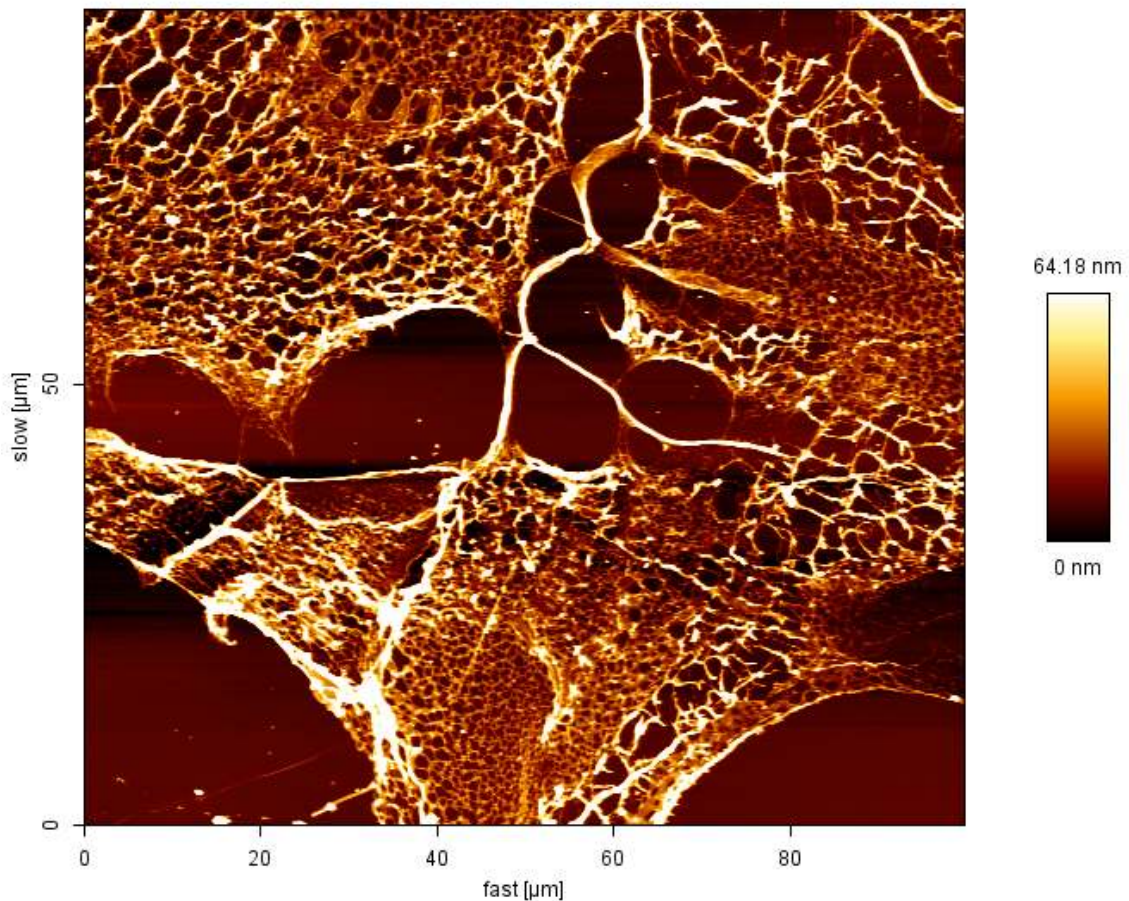


Abbildung 5.19: Abbildung 5.18 ohne die Beschädigung des Glimmerträgers im unteren Bereich der AFM-Aufnahme.

5.4 NMR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den zuvor schon beschriebenen physikalischen Messmethoden zur Charakterisierung der EPS auch kernmagnetische Resonanzuntersuchungen durchgeführt. Bei den verwendeten Verfahren handelt es sich um die ^1H -NMR-Spektroskopie, die ^{13}C -NMR-Spektroskopie, sowie Kombinationen beider Verfahren in Gestalt der HSQC-Methode (engl. Heteronuclear Single Quantum Coherence) und der COSY-Methode (Correlation-Spectroscopy), welche im Kapitel 4.5 näher beschrieben sind.

Die folgenden in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse belegen, dass durch den Ultraschallabbau der verwendeten Polysaccharide nicht die einzelnen Monomereinheiten zerstört werden, sondern nur eine Spaltung der Ketten zwischen den einzelnen Monomereinheiten auftritt. Außerdem bestätigen diese das Auftreten der Wechselwirkungen zwischen den bivalenten Kationen und der Hyaluronsäure, bzw. dem Xanthan.

5.4.1 Charakterisierung von Hyaluronsäure mittels NMR-Spektroskopie

Zur Charakterisierung der Hyaluronsäure werden unterschiedliche Abbaustufen der Hyaluronsäure mit verschiedenen NMR-Messungen untersucht. Diese Messungen zeigen eindeutig, dass mit zunehmender Abbaupzeit keine gravierenden Änderungen in den aufgenommenen Spektren bzw. in der molekularen Struktur auftreten. Durch den längeren Abbau wird hauptsächlich eine bessere Auflösung der einzelnen Peaks erreicht. Dies belegt auch Abbildung 5.20 in der ^1H -Spektren der Hyaluronsäure von verschiedenen Abbaustufen gezeigt sind.

Vergleicht man die Spektren der verschiedenen Abbaustufen der Hyaluronsäure mit dem der unabgebauten Hyaluronsäure, so fallen einem sehr kleine Peaks auf (mit Pfeilen gekennzeichnet), die bei der nichtabgebauten Hyaluronsäure scheinbar nicht auftreten. Um diese besser darzustellen und betrachten zu können, wird das Spektrum der über 17 Stunden abgebauten Hyaluronsäure stark vergrößert (Abbildung 5.21). Eine genauere Zuordnung dieser vergrößerten Peaks (mit Pfeilen gekennzeichnet) ist dadurch allerdings nicht möglich.

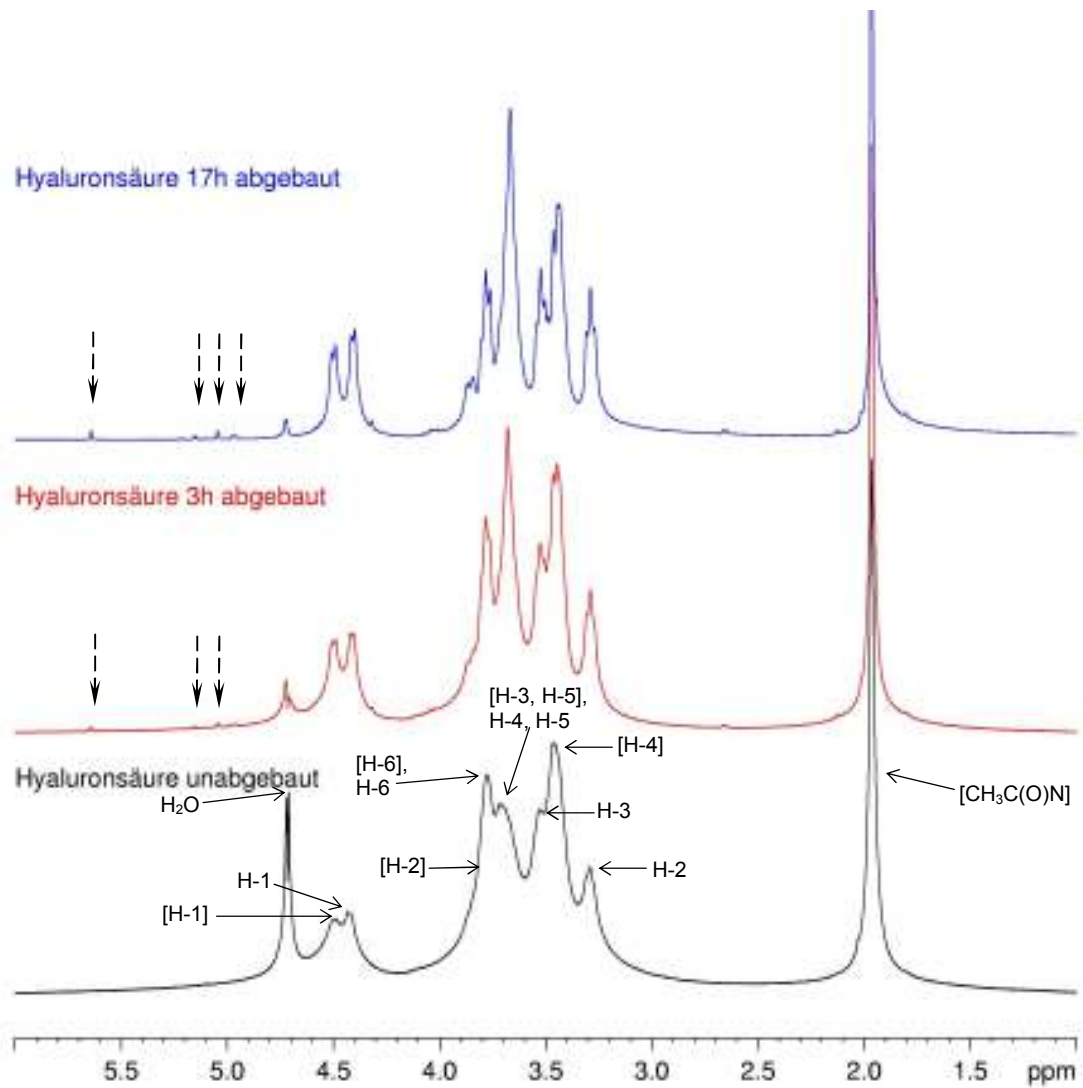


Abbildung 5.20: Vergleich der ^1H -Spektren verschiedener Abbaustufen der Hyaluronsäure^[88, 90, 92, 93].

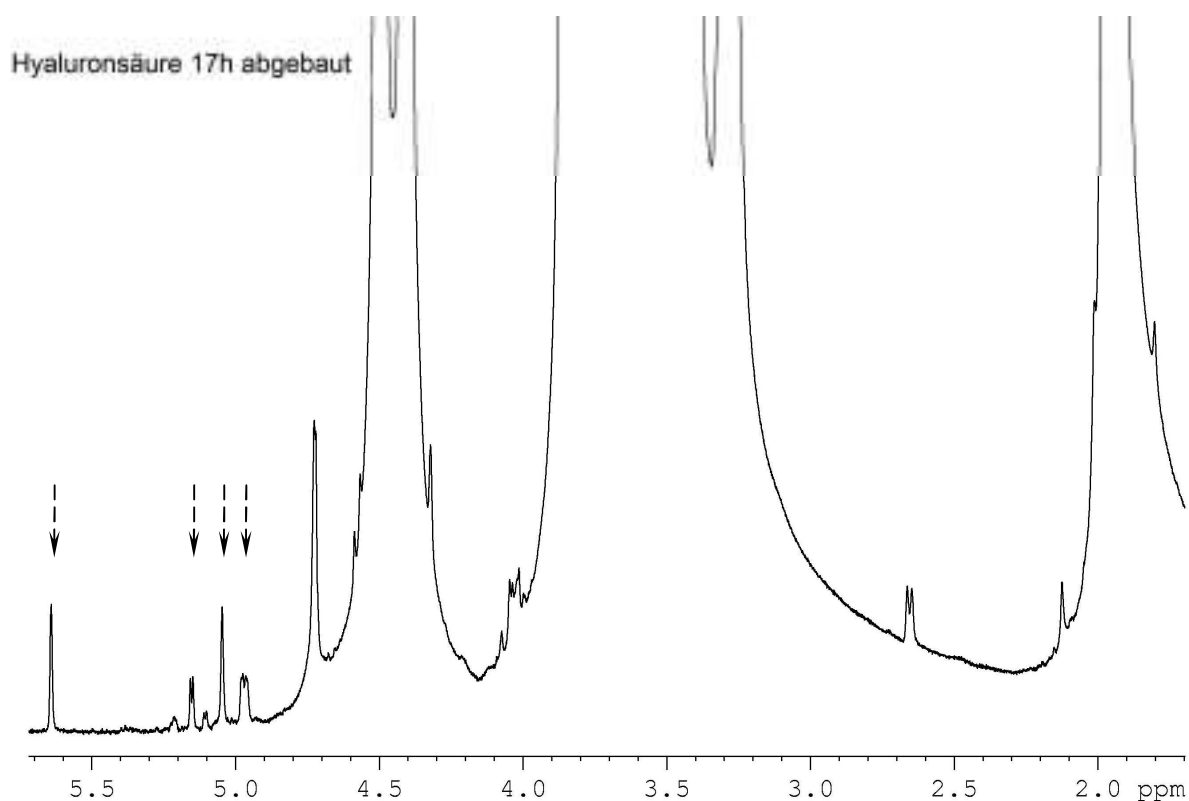


Abbildung 5.21: Vergrößerung des ^1H -Spektrums der 17h abgebauten Hyaluronsäure.

Zur Charakterisierung der Hyaluronsäure werden auch ^{13}C -Spektren aufgenommen, wobei man sich dabei auf Messungen mittels Korrelationsspektroskopie (COSY) und Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Methode konzentriert.

Bei den COSY-Experimenten treten ebenfalls kaum Änderungen in den Spektren auf, wenn man das unabgebaute Hyaluronat mit den verschiedenen Abbaustufen vergleicht. Die einzigen Änderungen, die auftreten, sind Verschiebungen der Peakintensität. In Abbildung 5.22 ist ein COSY-Spektrum von unabgebauter Hyaluronsäure im Vergleich zu 3 Stunden abgebauter Hyaluronsäure dargestellt.

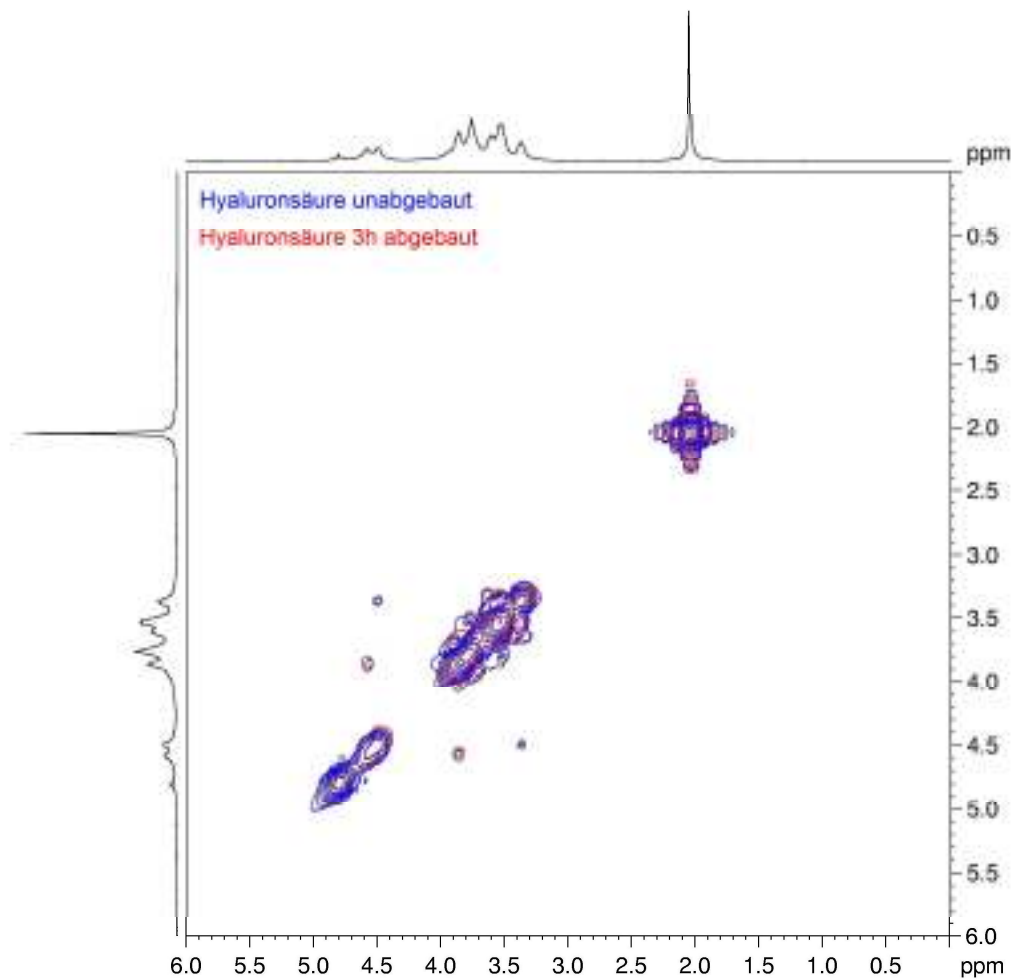


Abbildung 5.22: Vergleich der COSY-Spektren von unabgebauter Hyaluronsäure und drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure.

Bei den HSQC-Experimenten hingegen tritt ein Unterschied in den Spektren zwischen unabgebautem und 3 Stunden abgebautem Hyaluronat auf. Bei dem HSQC-Spektrum der 3 Stunden abgebauten Hyaluronsäure ist ein zusätzliches Signal bei 3,78 ppm in X-Richtung und 78,8 ppm in Y-Richtung gegenüber dem Spektrum der unabgebauten Hyaluronsäure vorhanden (siehe Pfeil). Dies ist deutlich in Abbildung 5.23 zu erkennen, denn in dieser Abbildung sind die HSQC-Spektren der unabgebauten und der 3 Stunden abgebauten Hyaluronsäure übereinander gelegt. Eine Zuordnung zu einem Signal aus dem entsprechenden ^1H -Spektrum ist auf Grund der schlechten Trennung der Peaks nicht möglich.

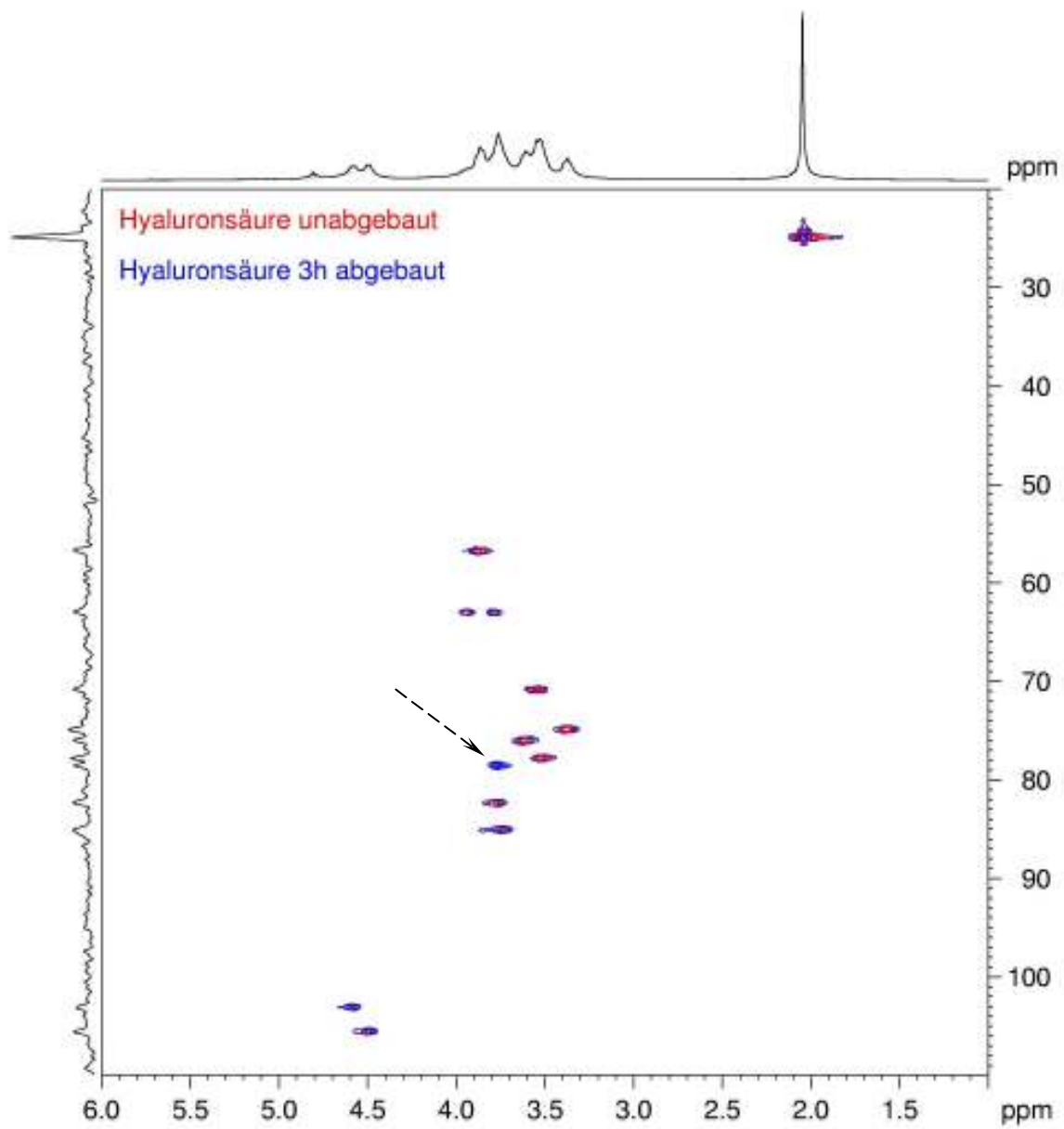


Abbildung 5.23: Vergleich der HSQC-Spektren von unabgebauter und 3h abgebauter Hyaluronsäure.

5.4.2 Charakterisierung von Xanthan mittels NMR-Spektroskopie

Zur Charakterisierung von Xanthan werden auch hier verschiedene Abbaustufen vom Xanthan mittels NMR betrachtet. Dabei fällt auf, dass das Signal-Rausch-Verhältnis und eine bessere Auflösung mit der einer Zunahme der Abbauzeit einhergehen. Dies ist deutlich in der Abbildung 5.24 zu erkennen, in der Protonenspektren von verschiedenen Abbaustufen des Xanthans dargestellt sind. Des Weiteren ist in dieser Abbildung deutlich zu sehen, dass außer beim unabgebauten Xanthan bei allen Spektren ein deutlich ausgeprägter neuer Peak bei circa 1,9 - 2,05 ppm zu erkennen ist. Es überrascht dabei, dass dieser Peak vom 3 Stunden abgebauten Xanthan zum 12 Stunden abgebauten erst deutlich anwächst, dann beim 16 Stunden abgebauten Xanthan wieder stark abnimmt und bei 26 Stunden abgebautem Xanthan wieder leicht zunimmt, während die anderen Intensitäten in den einzelnen Spektren verhältnismäßig konstant bleiben.

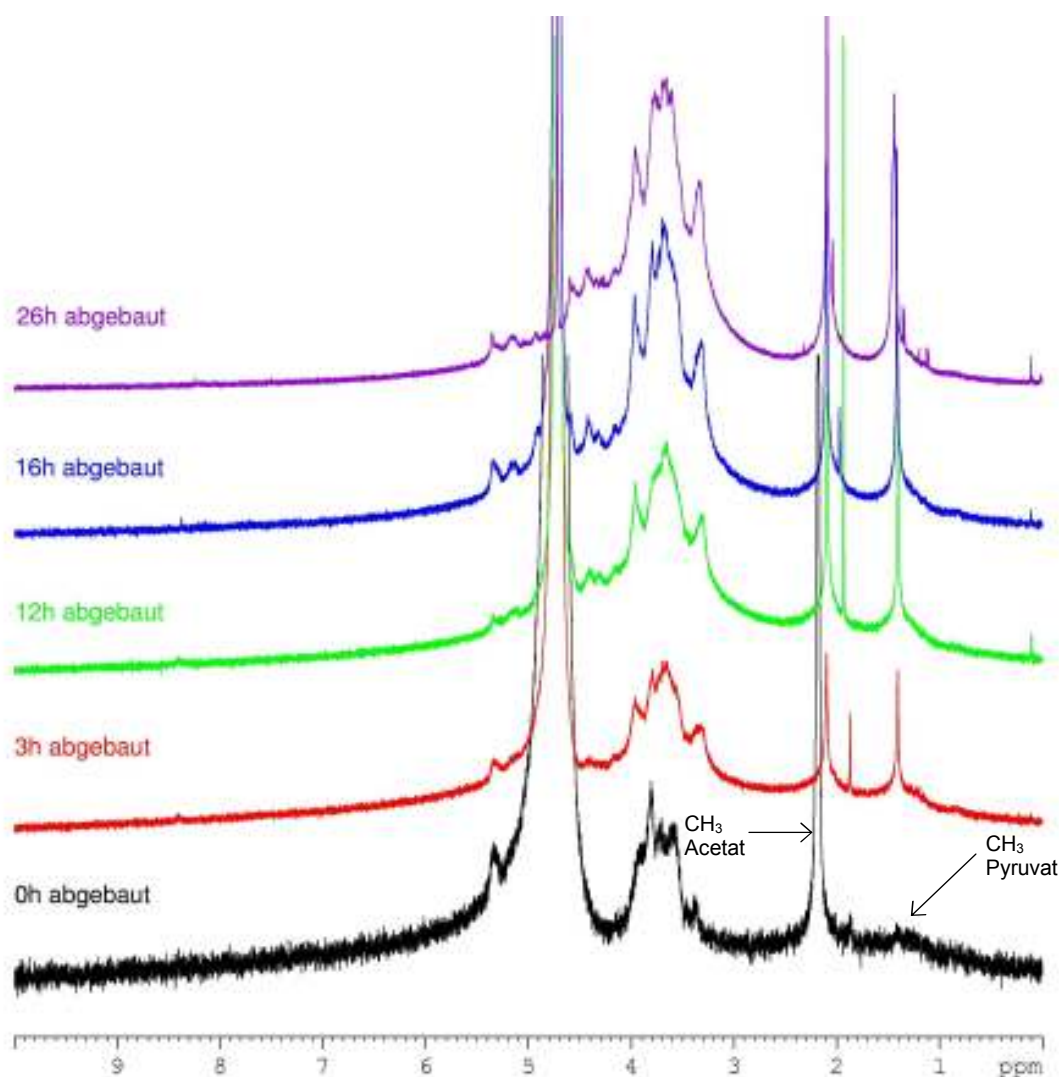


Abbildung 5.24: Vergleich der ^1H -Spektren verschiedener Abbaustufen des Xanthans^[91, 94]

Beim erstmaligen Auftreten diese zusätzlichen Peaks, liegt zuerst die Vermutung nahe, dass es sich dabei um eine Verunreinigung des Messröhrchens mit Aceton handelt. Um die Annahme zu überprüfen, ob es sich um Aceton handelt wird die Probe des 12 Stunden abgebauten Xanthan mit 10 μL Aceton versetzt und ein weiteres Protonenspektrum aufgenommen. Dieses Spektrum (siehe Abbildung 5.25) unterscheidet sich gravierend von dem Spektrum der mutmaßlich verunreinigten Probe, denn das Spektrum der Probe mit 10 μL Aceton weist die für Aceton typische Aufspaltung in ein Triplett auf (siehe Pfeile), wie der Vergleich der Spektren deutlich zeigt.

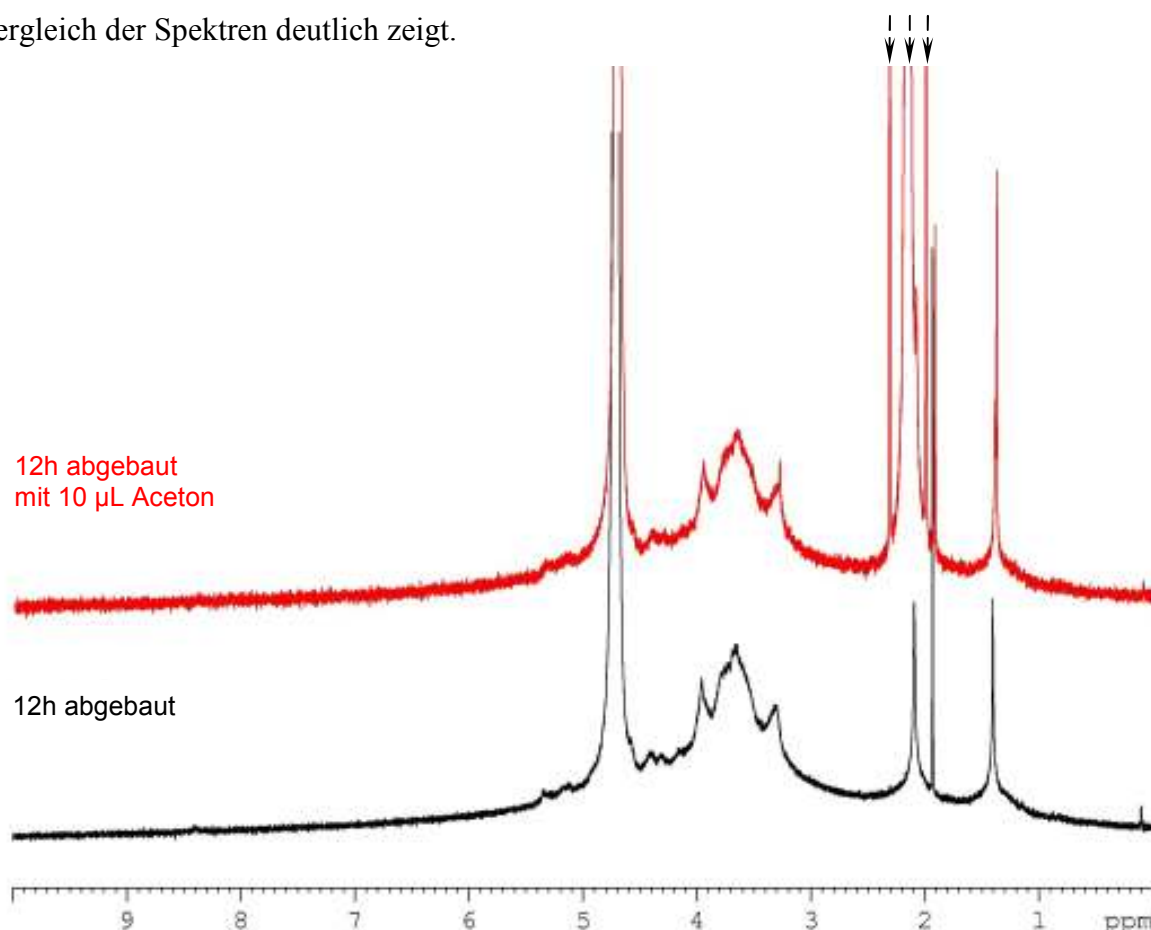


Abbildung 5.25: ^1H -Spektren des reinen 12 h abgebauten Xanthans und des 12 h abgebauten Xanthans mit 10 μL Aceton.

Um dennoch eine Aussage darüber treffen zu können, was die Ursache für das Auftauchen dieses Peaks ist, wird das 26 Stunden abgebaute Xanthan genauer untersucht, indem mehrere Tage hintereinander Spektren aufgenommen werden. Dabei zeigt sich, dass dieser Peak bei 2,11 ppm mit der Zeit anwächst. Dies deutet darauf hin, dass sich eine Änderung in den einzelnen Monomereinheiten vollzieht, welcher von einem bakteriellen Abbau herrühren kann. Somit müsste es sich bei dem unbekannten Peak um Essigsäure handeln, welche bei dem bakteriellen Abbau entsteht. Diese Vermutung wird durch eine erneute Aufnahme eines

^1H -Spektums unter vorheriger Essigsäurezugabe bestätigt, da dieses Signal im Anschluss daran deutlich angewachsen ist, und kein weiteres Signal zu erkennen ist. Dies ist in Abbildung 5.26 dargestellt.

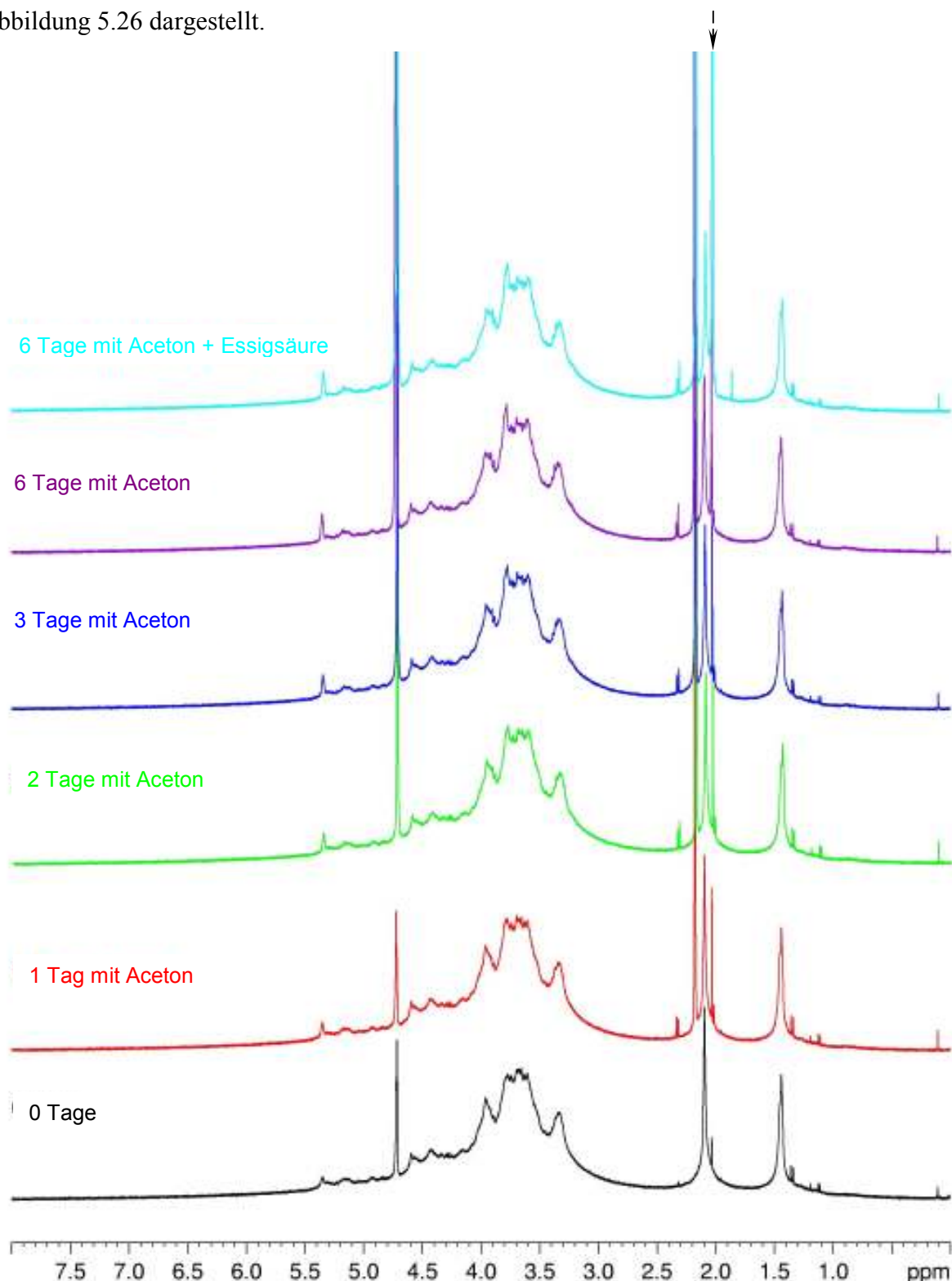


Abbildung 5.26: Vergleich des ^1H -Spektrums von 26 h abgebauten Xanthan nach 0 Tagen, 1; 2; 3 und 6 Tagen mit Aceton und nach 6 Tagen mit Aceton und Essigsäure.

Von den verschiedenen Abbaustufen des Xanthan werden, ebenso wie bei der Hyaluronsäure, zur genauen Charakterisierung, ebenfalls ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen. Ebenso wie auch schon bei der Hyaluronsäure, treten beim Xanthan ebenfalls keine Änderungen in den Spektren bzw. in der molekularen Struktur für die verschiedenen Abbaustufen auf. Es ist zum Teil nur eine Verschiebung der Peaks zwischen den einzelnen Spektren zu erkennen.

5.4.3 Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Hyaluronsäure und bivalenten Kationen

Wie schon durch die Ergebnisse der konduktometrischen und rotationsviskosimetrischen Messungen in dieser Arbeit gezeigt wurde, geht Hyaluronsäure mit bivalenten Kationen Wechselwirkungen ein. Unter Zuhilfenahme der NMR-Spektroskopie werden diese Wechselwirkungen näher untersucht. Hierzu werden sowohl die ^1H -NMR-Spektroskopie als auch ^{13}C -NMR-Spektroskopie verwendet. Bei diesen beiden Messmethoden werden jeweils die Messungen der reinen Hyaluronsäure und die Messungen der Hyaluronsäure mit Salzzusatz miteinander verglichen.

Im Folgenden werden zunächst die ^1H -NMR-Spektren von der über 3 Stunden abgebauten Hyaluronsäure (75 mg/mL in D_2O) ohne Zusatz von Schwermetallen sowie mit Zusatz von 1,2 mmol/L Metallkationen (Ba^{2+} und Ni^{2+}) betrachtet. Diese Spektren werden, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, bei einer Temperatur von 60°C aufgezeichnet und sind in Abbildung 5.27 dargestellt. Die in dieser Abbildung gezeigte Signalzuordnung wird unter Zuhilfenahme der in der Literatur dargestellten Ergebnisse vorgenommen ^[88, 90, 92, 93, 96].

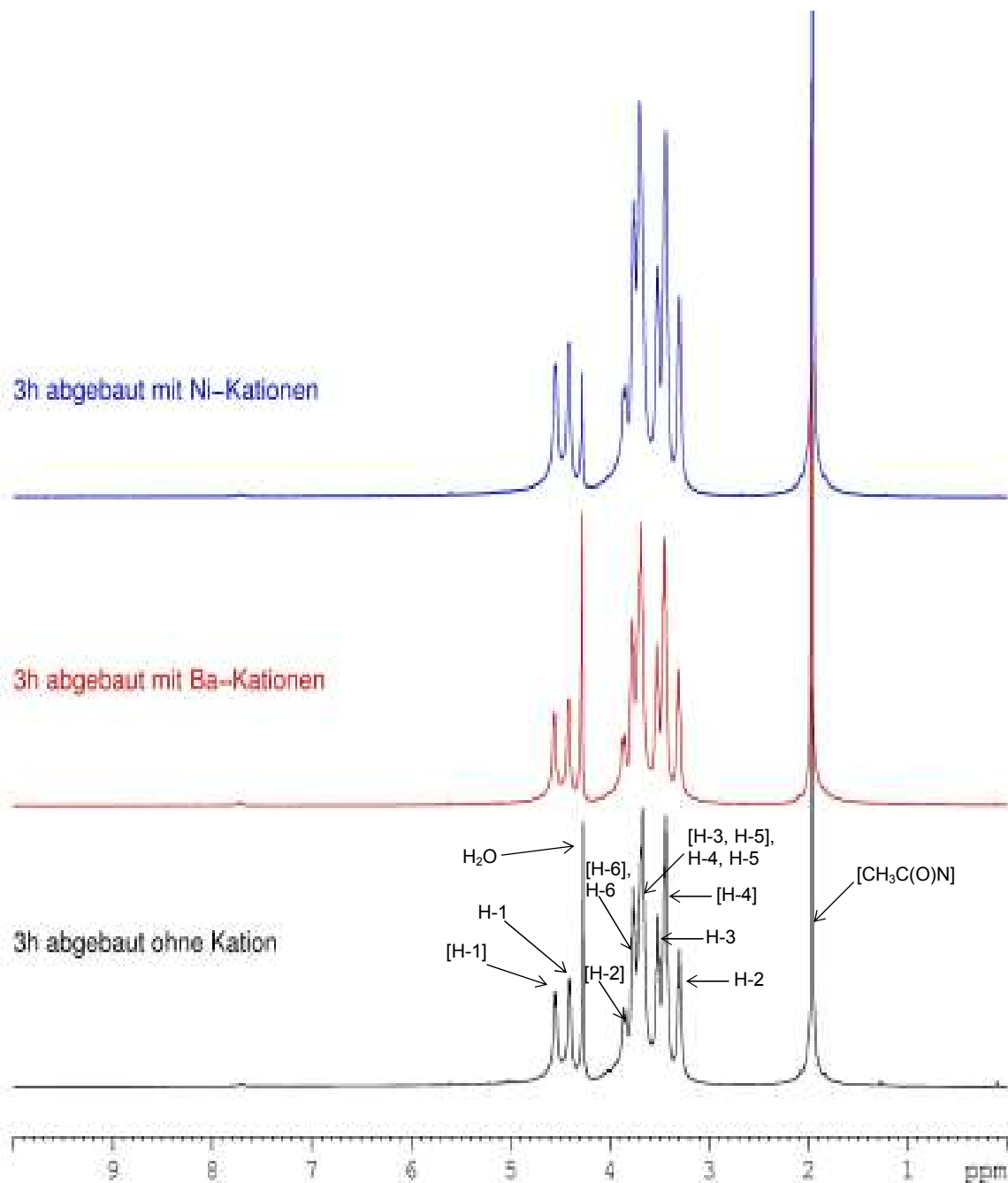


Abbildung 5.27: Vergleich der ^1H -Spektren von drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure ohne Zugabe von Kationen, sowie in Anwesenheit von Ba^{2+} - und Ni^{2+} -Kationen. Die Signale, die zum N-Acetyl-D-glucosamid gehören, sind durch eckige Klammern ([...]) gekennzeichnet.

Vergleicht man die drei gezeigten Spektren miteinander, ist deutlich zu erkennen, dass kaum nennenswerte Änderungen in den einzelnen Spektren auftreten. Bei den beiden Spektren, bei

denen zu der Hyaluronsäure noch Schwermetallkationen dazugegeben werden, ist eine etwas schlechtere Auflösung zu erkennen. Es ist aber, wie bei dem reinen Hyaluronat, trotzdem noch eine eindeutige Signalzuordnung möglich. Eine gravierende Peakverbreiterung der Signale des N-Acetyl-D-glucosamid-Restes ist nicht vorhanden. Ebenfalls ändert sich das Acetamido-Signal nicht erkennbar.

Für die Untersuchungen mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie werden dieselben Proben, die auch zur Aufnahme der ^1H -Spektren genutzt werden, verwendet. Auch hier werden die Messungen wieder bei 60°C durchgeführt. Vergleicht man nun auch hier die unterschiedlichen Spektren der verschiedenen Proben miteinander, so sind hier ebenfalls keine gravierenden Änderungen in den einzelnen Spektren zu erkennen. Die Auflösung der Spektren der Proben mit Schwermetallkationen ist zwar gegenüber dem Spektrum der reinen drei Stunden abgebauten Hyaluronsäure etwas schlechter, aber das Signal-Rauschverhältnis verschlechtert sich nicht so stark, dass eventuell Peaks verschwinden oder nicht mehr eindeutig zu zuordnen sind. Ebenfalls ändert sich auch die relative Linienbreite für die einzelnen Signale nicht signifikant, z.B. wie in früheren Arbeiten die Linienbreite für das Signal des Carboxylat-Kohlenstoffs oder das C-6-Signal der Hydroxymethyl-Gruppe des Acetylglucosamids, wodurch diese nicht mehr eindeutig nachweisbar waren. Die einzige geringe Veränderung die auftritt ist, dass das C-5-Signal der Glucuronsäure in der Gegenwart von Ni^{2+} -Kationen eine geringere Intensität aufweist. Dies ist auch in den in Abbildung 5.28 gezeigten ^{13}C -Spektren sehr deutlich zu erkennen. Die Peakzuordnung fand hier ebenfalls gemäß Literatur statt ^[88, 90, 92, 93, 96].

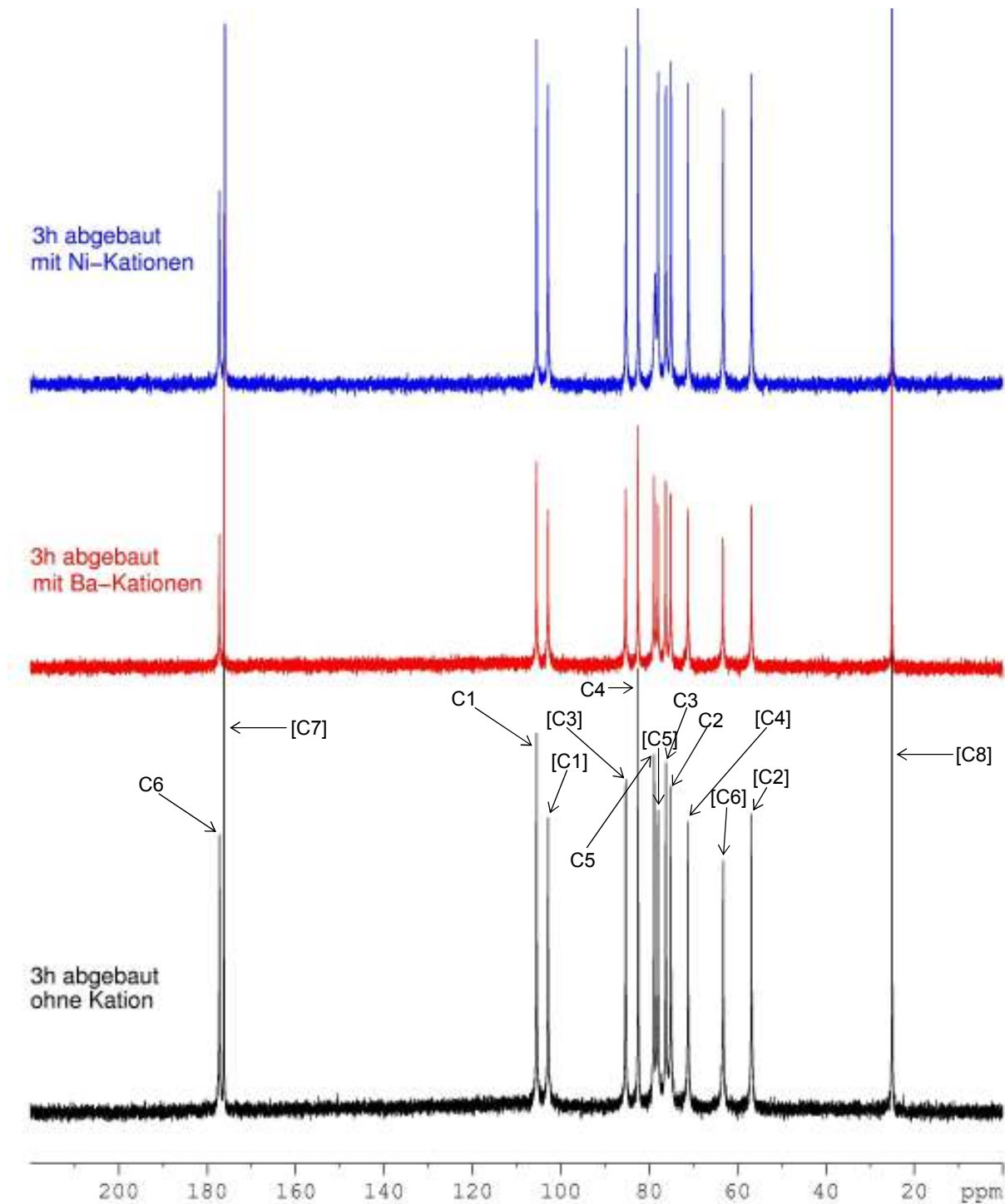


Abbildung 5.28: Vergleich der ^{13}C -Spektren von drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure ohne Zugabe von Kationen, sowie in Anwesenheit von Ba^{2+} - und Ni^{2+} -Kationen. Die Signale, die zum N-Acetyl-D-glucosamid gehören sind durch eckige Klammern ([...]) gekennzeichnet.

5.4.4 Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Xanthan und bivalenten Kationen

Zur weiteren Charakterisierung der nachgewiesenen Wechselwirkungen zwischen Xanthan und den bivalenten Schwermetallkationen werden auch hier die ^1H -NMR-Spektroskopie und die ^{13}C -NMR-Spektroskopie, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, verwendet. Für diese Untersuchungen wird fünfzehn Stunden abgebautes Xanthan verwendet, da sich diese Abbaustufe als ideal für die Aufnahme von NMR-Spektren erwies. Diese NMR-Messungen werden mit Xanthanlösungen mit einer Konzentration von 125 mg/mL in D_2O bei 60°C durchgeführt. Bei Messungen mit einem Schwermetallkation (Ba^{2+} , Ni^{2+} oder Cr^{3+}), werden zusätzlich noch 1,2 mmol/L des jeweiligen Schwermetallsalzes dazugegeben.

Betrachtet man zunächst erst mal wieder die einzelnen ^1H -NMR-Spektren im Vergleich miteinander, so sind, wie auch schon bei der Hyaluronsäure, nur leichte Änderungen in den einzelnen Spektren zu erkennen. Dies zeigt auch der Vergleich der ^1H -Spektren von fünfzehn Stunden abgebautem Xanthan ohne Salzzusatz gegenüber fünfzehn Stunden abgebautem Xanthan mit Ba^{2+} -, Ni^{2+} - bzw. Cr^{3+} -Ionen in Abbildung 5.29. In dieser Abbildung ist, soweit wie aus der Literatur bekannt ^[89, 91, 94, 95], eine Peakzuordnung gezeigt.

Ein kleiner Unterschied, der zwischen dem Spektrum des Xanthans ohne Salzzusatz und denen mit Salzzusatz zu erkennen ist, ist, dass bei den Spektren mit Salzzusatz eine Linienverbreiterung auftritt und sich somit das Signal-Rausch-Verhältnis für einzelne Signale verschlechtert. Außerdem ist die Peakaufspaltung im Bereich von 3,2 ppm bis 4,2 ppm bei den Spektren mit Metallkationen schlechter als bei dem des reinen Xanthans. Am stärksten ist dieser Effekt bei dem Spektrum mit Ba^{2+} -Kationen zu erkennen. Bei dem Spektrum von Xanthan mit Cr^{3+} -Kationen ist dieser Effekt am geringsten. Die Zunahme der relativen Linienbreite in dem genannten Bereich ist aber nicht genau bestimmbar, da eine eindeutige Zuordnung in diesem Bereich durch den Einfluss der Kationen nicht möglich ist. Die Auflösung einzelner Peaks verschlechtert sich aber nicht so stark, dass dadurch teilweise die Aufspaltungen einzelner Peaks in diesem Bereich völlig verschwinden, wie es in früheren Arbeiten gezeigt wird.

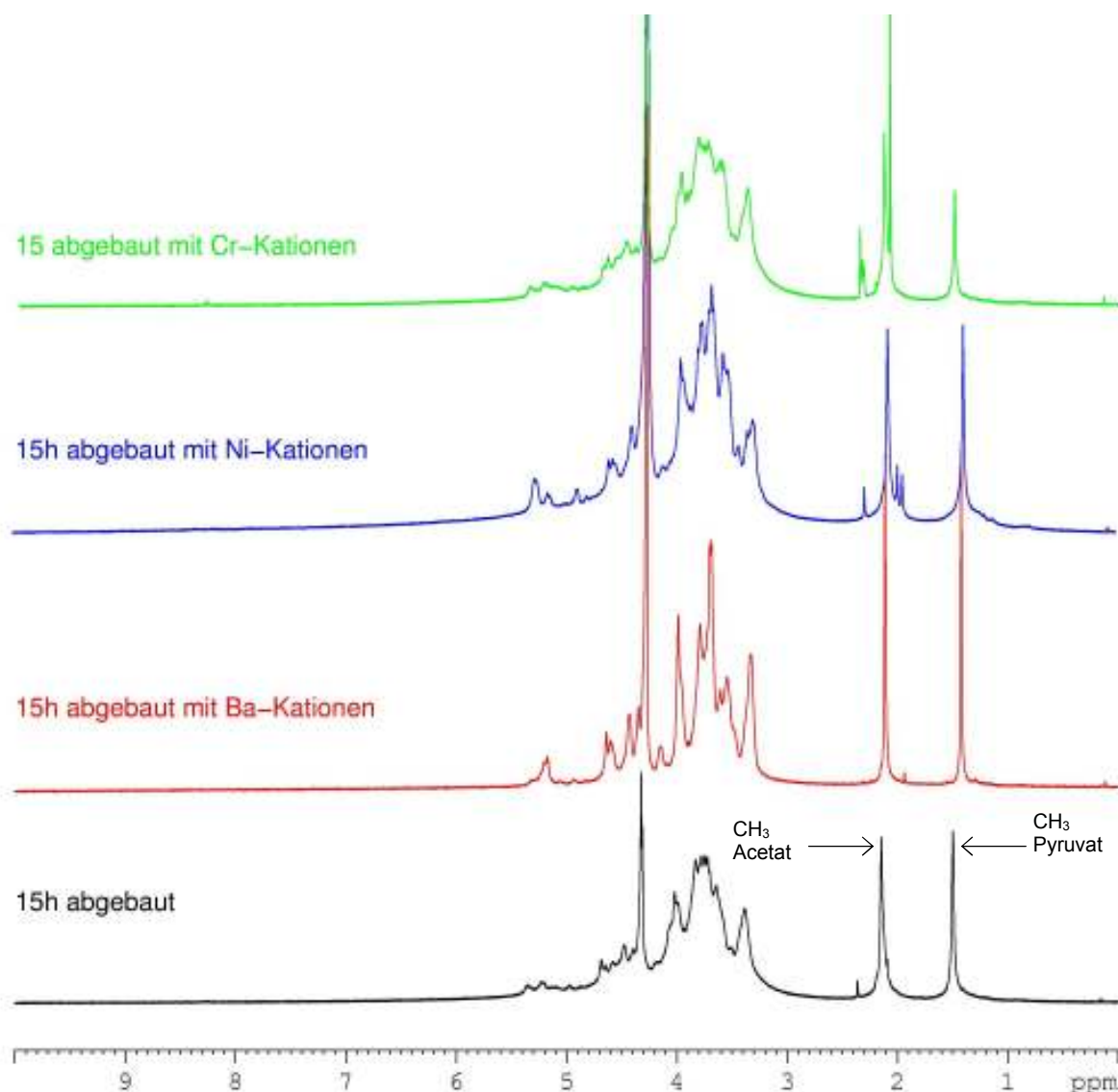


Abbildung 5.29: Vergleich der ^1H -Spektren von fünfzehn Stunden abgebautem Xanthan ohne Zugabe von Kationen sowie in Anwesenheit von Ba^{2+} -, Ni^{2+} - und Cr^{3+} -Kationen.

Die Messungen der ^{13}C -NMR-Spektroskopie werden mit denselben Xanthanproben, mit denen auch die ^1H -Spektren aufgenommen werden, durchgeführt. Der Vergleich der jeweiligen Spektren der unterschiedlichen Proben weist auch hier leichte Unterschiede auf. Wie schon bei den ^1H -Spektren von den verschiedenen Xanthanlösungen verschlechtert sich die Auflösung nur zum Teil, bzw. das Signal-Rauschverhältnis einzelner Signale mit Metallkation, zu dem ohne Kation. Eine Zuordnung der einzelnen Peaks bleibt aber im Großen und Ganzen möglich und wird, wie die folgende Abbildung 5.30 zeigt, gemäß der Literatur vorgenommen [89, 91, 94, 95].

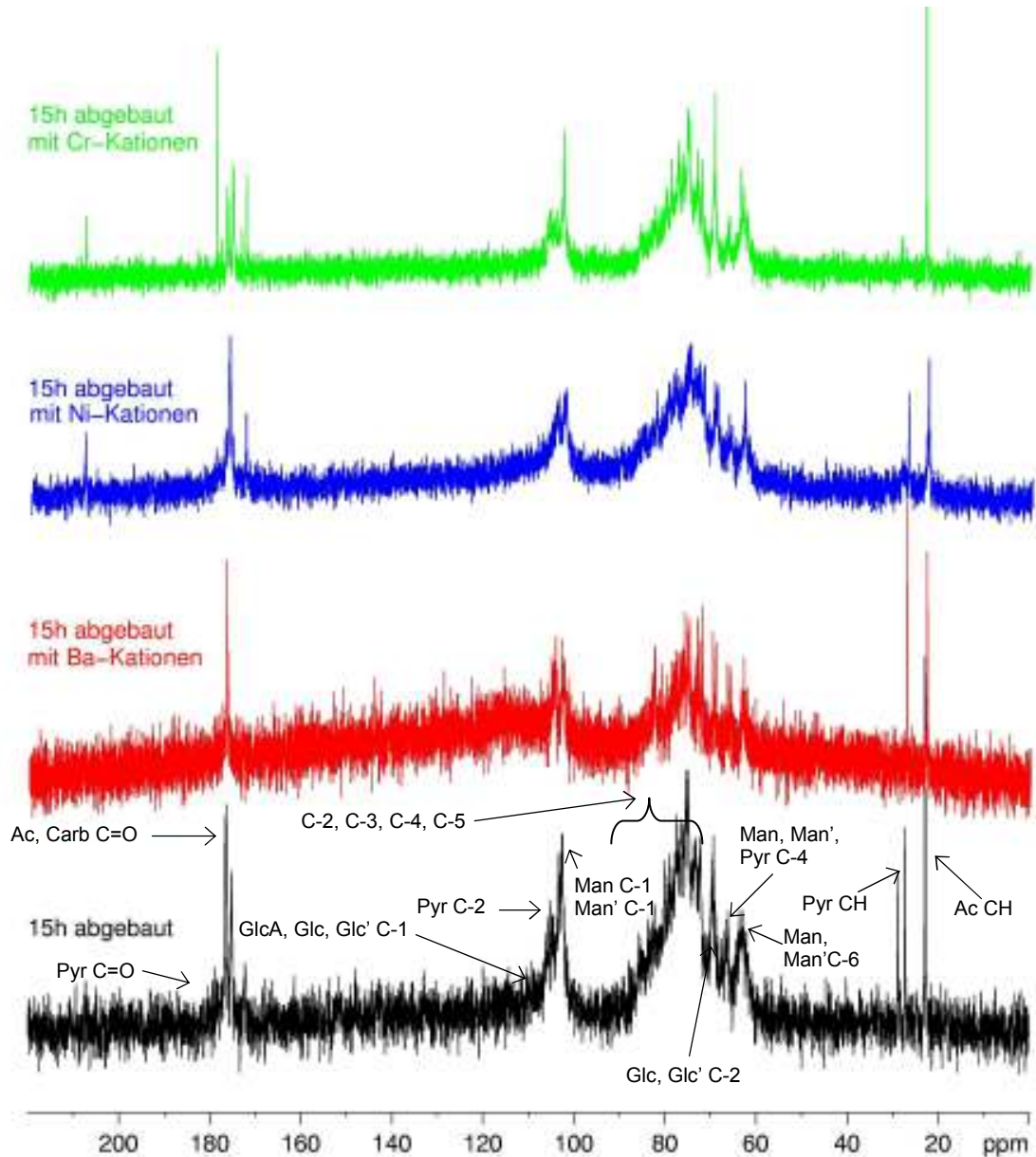


Abbildung 5.30: Vergleich der ^{13}C -Spektren von fünfzehn Stunden abgebautem Xanthan ohne Zugabe von Kationen, sowie in Anwesenheit von Ba^{2+} -, Ni^{2+} - und Cr^{3+} -Kationen.

In dieser Abbildung sind, wie auch schon die Abbildung 5.29 der verschiedenen ^1H -Spektren des Xanthan zeigt, regiospezifische Wechselwirkungen deutlich, was bedeutet, dass hier ebenfalls eine Beschränkung der Wechselwirkungen auf einzelne wenige Signale beobachtet wird. Dabei handelt es sich vor allem um die Signale in den Bereichen um 28 ppm, 105 ppm und 178 ppm. Außerdem unterscheiden sich die Stärken der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Kationen, da sich die jeweiligen einzelnen Spektren auch leicht unterscheiden und der Einfluss der einzelnen Kationen auf das jeweilige Spektrum unterschiedlich stark ist. Unter anderem werden Unterschiede im Bereich des Signals des Carboxylat-Kohlenstoffs

sowie des CH_3 -Signals der Pyruvat-Gruppe detektiert. Darüber hinaus wird eine Zunahme der Linienbreite für das C-2-Signal der Pyruvat-Gruppe sowie dem gesamten C-1-Signal aller Zuckerringe (bei 105 ppm) beobachtet. Dies führt, wie in der gezeigten Abbildung ersichtlich, zu einer Abnahme der Signalauflösung, so dass die Resonanzen nur wenig differenziert aufgezeichnet werden können.

6 Diskussion

6.1 Verhalten der Polysaccharide in Abwesenheit von mehrwertigen (Schwer-) Metallkationen

6.1.1 Ziel der Untersuchungen

Durch die bekannte Prägnanz von Schwermetallen in aquatischen Systemen und dem Wissen aus früheren Untersuchungen, dass das Alginat eine außerordentlich hohe Affinität zu mehrwertigen Metallionen, (besonders über die Carboxylatgruppen der Guluronate zu Calcium(II)-Ionen), aufweist, besteht ein großes Interesse daran, den Einfluss von ökologisch relevanter Schwermetallkationen auf Biofilme zu untersuchen ^[38]. Außerdem könnte dabei auch untersucht werden, welche Rolle die Ladung bzw. der Verzweigungsgrad der EPS bei den Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Kationen und dem jeweiligen Biopolymer spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Wechselwirkungen von mehrwertigen Schwermetallionen mit extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und die resultierende Struktur der sich bildenden Komplexe näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden drei Modellpolysaccharide exemplarisch für die von Bakterien exprämierten EPS jeweils in Abwesenheit und in Anwesenheit von mehrwertigen Metallkationen untersucht und die so erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen. Bei den Polysacchariden handelt es sich um das verzweigte, ungeladene Dextran, der unverzigten, geladenen Hyaluronsäure und das verzweigte und geladene Xanthan.

6.1.2 Vorbereiten der Polymerproben

Um mit den verwendeten physikalischen Methoden reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen die verwendeten Polysaccharide zuvor entsprechend präpariert werden. Zunächst muss gewährleistet sein, dass eine gleichbleibende Qualität der zu untersuchenden Proben sichergestellt ist. Außerdem stellt die hohe Viskosität der Polymerlösungen, welche sich beim Lösen unbehandelter Polymere einstellt, ein großes Hindernis dar. Aus diesem Grund wird die Aufarbeitung der kommerziellen EPS, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, durchgeführt.

Für die Auswahl einer geeigneten Prozedur für den Molmassenabbau wird auf Erfahrungen aus früheren Arbeiten zurückgegriffen. Um einen Vergleich der Substanzen und damit eine

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu garantieren, ist es wesentlich, dass die Reinigungsprozedur keinerlei unerwünschte Effekte auf die Seitenketten bzw. die funktionellen Gruppen der jeweiligen Polysaccharide ausübt. Dies war der Grund, warum die „milde saure Hydrolyse“, wie sie von Mayer et al. zum Abbau von Alginaten verwendet wurde, für die hier untersuchten Polysaccharide ausschied ^[38]. Bei dieser Methode kann beobachtet werden, dass sowohl die glycosidischen Bindungen als auch die Acetamido-Gruppen des Hyaluronats gespalten werden. Dies führt zu einer Verfälschung der Untersuchungsergebnisse, da die Acetamido-Gruppe die physikalischen Eigenschaften des Hyaluronats signifikant beeinflusst. Theoretisch wäre die enzymatische Degradation eine weitere Möglichkeit für die selektive Spaltung von glycosidischen Bindungen, denn dabei greifen die eingesetzten Enzyme im Idealfall wie eine Schere zwischen die Zuckerringe und trennen diese voneinander. Bei der Spaltung der Hyaluronsäure zeigt diese Methode gute Ergebnisse, aber beim Xanthan scheitert diese an einer nicht ausreichenden Selektivität, da hierbei zusätzlich eine Spaltung der Zuckerbindungen an den Seitenketten beobachtet wird. Dies stellt den Grund dar, weshalb diese Art des Abbaus ebenfalls nicht verwendet wird. Stattdessen erscheint die Methode des Ultraschallabbaus für die Untersuchungen in dieser Arbeit am geeignetsten, denn dadurch wird die gewünschte Verringerung der Viskosität der Polymerlösungen lediglich durch die Reduktion der Molarenmasse erreicht, ohne dass die lokale Struktur der Ketten signifikant beeinflusst wird.

Neben dem Molmassenabbau ist die Reinigung und damit die Entfernung von Fremdstoffen, die bei der Fermentation oder beim Abbau in Proben eingebracht wird, essentiell. Die Abtrennung wird mit Hilfe von Filtration und anschließender Zentrifugation vollzogen. Fremdsalze und Fragmente, die leichter als 12.000 bis 14.000 g/mol sind, werden durch Dialyse beseitigt.

6.1.3 Dextran

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit kommt dem Dextran eine Sonderstellung zu, da es als Vertreter der ungeladenen Polysaccharide als Vergleichssubstanz bezüglich der geladenen Polysaccharide dient. Des Weiteren bietet es durch seine verzweigte Struktur darüber hinaus die Möglichkeit, den Einfluss der Seitenketten auf die physikalischen Eigenschaften zu untersuchen.

Das kommerzielle Dextran, welches in dieser Arbeit verwendet wird, ist mit einer Molmasse von $2,0 \cdot 10^5$ g/mol das kleinste der untersuchten Polysaccharide. Es besitzt trotz seines hohen

Verzweigungsgrades in wässriger Lösung eine niedrige Viskosität (siehe Kap. 5.2.1), was wahrscheinlich auf die mangelnde Ladung zurückzuführen ist. Dies hat zur Folge, dass es nur zur geringen Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen kommt und kleine hydrodynamische Radien der einzelnen Moleküle vorliegen. Außerdem ist eine Vernetzung des Dextrans ebenfalls auszuschließen, da sich die Viskosität nur sehr gering von der des Wassers abhebt. Die gute Löslichkeit in einer wässrigen Phase ist auf die Hydroxylgruppen zurückzuführen, welche über das ganze Polymer verteilt sind und welche vermutlich zur Bildung von kompakten Knäueln führen. Dafür sprechen die Ergebnisse einer früheren Arbeit, bei der der Exponent α der Mark-Houwink-Gleichung bestimmt wurde. Dieser wurde dort mit Hilfe der spezifischen Viskosität des Dextrans in wässriger Lösung ermittelt und beträgt $\alpha=0,11$ ^[97]. Somit liegt die Geometrie zwischen einer Kugel ($\alpha=0,0$) und einer Gauß-Kette ($\alpha=0,50$) ^[67]. Bei höheren Konzentrationen ist allerdings, laut Literatur, eine Quellung des Dextrans als Folge des Kontakts zwischen den hydrodynamischen Äquivalenzsphären und damit eine starke Zunahme der Viskosität bekannt ^[98]. Die kritische Konzentration des Dextrans wird bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erreicht, weshalb es somit nicht zu einer Polymer-Polymer-Verhakung (Entanglements) kommt.

6.1.4 Hyaluronsäure

Bei der Hyaluronsäure handelt es sich um ein unverzweigtes, geladenes, bifunktionelles Copolymer, welches sich aus alternierenden β -1,3- und β -1,4- verknüpften Monomereinheiten zusammensetzt. Die physikalischen Eigenschaften der Hyaluronsäure werden stark durch die funktionellen Gruppen des Glucuronat, sowie des Glucosamin beeinflusst, weshalb das Wissen um das quantitative Erscheinungsbild in einem Molekül essentiell ist. Die molare Masse der kommerziellen Hyaluronsäure beträgt $1,7 \cdot 10^6$ g/mol und ist somit in etwa 10-mal größer als die von Dextran.

Die Literatur beschreibt, dass die Hyaluronsäure eine ungemein starke Wasserbindefähigkeit aufweist ^[52], welche für einen Biofilm von großer Bedeutung ist, denn für den Metabolismus der meisten Organismen ist die Präsenz von externen Wasser unabdingbar. Ohne dieses Wasser wird der Stoffwechsel gravierend gestört und führt auf Dauer zur Austrocknung der Lebensform. Durch die starken intramolekularen bzw. intermolekularen Wechselwirkungen bildet die Hyaluronsäure im festen Zustand eine besonders kompakte sowie stabile Form, wobei die Wasserstoffbrücken eine wesentliche Rolle spielen. Durch

Röntgenbeugungsexperimente fand Mitra et al. heraus, dass das Hyaluronat sowohl als Einfach- und Doppel- als auch als Dreifachhelix vorliegen kann. Dabei ist das Gegenion Natrium oktaedrisch koordiniert, was zu einer zusätzlichen intra- bzw. intermolekularen Verknüpfung der Hyaluronatfasern führt^[99].

Solvatisierungsvorgänge führen in wässriger Lösung zu einer Aufweitung der Molekülstruktur, so dass sich durch die Änderung der Reibungseigenschaften der Lösung deren Viskosität ändert. Betrachtet man das hydrodynamische Volumen der Polymerteilchen, so ergibt sich eine Beziehung zwischen dem hydrodynamischen Volumen und der Molmasse. Diese Beziehung wird durch den Staudingerindex formuliert, wobei es sich um das Verhältnis des hydrodynamischen Volumens zur Molmasse handelt. Statistische Knäuel weisen die charakteristische Eigenschaft auf, dass deren Dichte mit steigender Molmasse abnimmt, was in einer früheren Arbeit nachgewiesen wurde^[97]. Theoretische Betrachtungen bezüglich der Konformation der Hyaluronsäure haben gezeigt, dass die Hyaluronsäure in wässriger Lösung, ähnlich wie im festen Zustand, eine helikale Struktur aufweist. Die Berechnungen, die von Haxaire et al. vollzogen wurden, weisen einen weiteren energetisch stabilen Bereich für die Hyaluronsäure mit diversen helikalen Moden entlang der Hyaluronatfaser nach^[100]. Das Erscheinungsbild der Struktur dabei reicht über eine linkshändig vierfach gefaltete bis hin zu einer rechtshändig fünffach gefalteten Symmetrie. Die jeweilige Struktur ist dabei sowohl vom pH-Wert der Hyaluronatlösung als auch von der Art der Gegenionen abhängig. In Abbildung 6.1 sind einmal parallele und einmal orthogonale energieminierte Strukturen der Hyaluronsäure gezeigt.

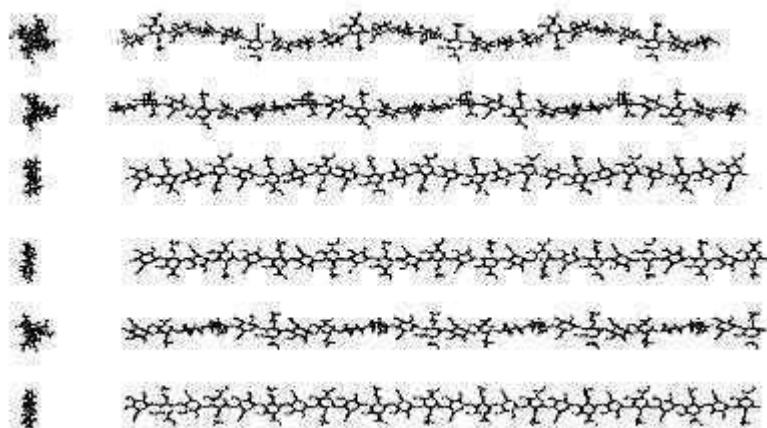


Abbildung 6.1: Exemplarische Darstellung von Hyaluronat in wässriger Lösung nach Berechnung von Haxaire et al.^[100].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten AFM-Aufnahmen zeigen auch deutlich, dass das Hyaluronat in verschiedenen Molekülstrukturen vorliegen kann. In der in Abschnitt 5.3.1

dargestellten Abbildung 5.12 ist eine eindeutig ausgeprägte Netzwerkstruktur mit einzelnen verbrückenden Strängen zu erkennen. Höhenmessungen dieser einzelnen Stränge belegen, dass es sich dabei um Doppelhelices der Hyaluronsäure handeln muss, denn diese zeigen eindeutig, dass diese Stränge zwischen fünf und sechs Nanometer hoch sind, was die charakteristische Höhe für Doppelhelices der Hyaluronsäure darstellt. Die in Abbildung 5.14 gezeigte AFM-Aufnahme von 0,25 mg/mL der über drei Stunden abgebauten Hyaluronsäure mit der dazugehörigen Höhenmessung zeigen einzelne Hyaluronsäureketten. Die Höhenmessungen ergeben eine Höhe von 1,0 nm bis 1,5 nm, was mit der den von Cowman et al. gemessenen Höhen für einzelne Hyaluronsäureketten übereinstimmt ^[101].

Im Rahmen chiroptischer sowie in NMR-Untersuchungen wurde entgegen der Annahme, dass die Struktur der Hyaluronsäure in wässriger Lösung im Wesentlichen aus einem statistischen Knäuel besteht ^[102], eine lokale Ordnung bestätigt ^[103, 104].

Die durch ¹³C-NMR-Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse von Hyaluronsäurefragmenten niedriger Molmassen deuten darauf hin, dass Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Monomereinheiten zu einer Stabilisierung entlang der Polymerfaser führen ^[105]. Von Scott et al. wird des weiteren postuliert, dass die direkten intramolekularen Wasserstoffbrücken, wie sie z.B. im Dimethylsulfoxid vorhanden sind, in wässrigen Lösungen durch Wassermoleküle und die von ihnen ausgehenden Wasserstoffbrücken substituiert werden. Dies stellt die Erklärung für die starke Wasserbindungsfähigkeit der Hyaluronsäure dar, bei der sich intensive Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen bilden. So ist die hohe Wasserabsorption durchaus nachvollziehbar, denn neben der großen Anzahl der potenziellen Anbindungspunkte wird eine zusätzliche Bildung von Wassereinschlüssen berücksichtigt. Eine mögliche Konfiguration einer solchen Tetrasaccharideinheit in wässriger Lösung ist in Abbildung 6.2 dargestellt.

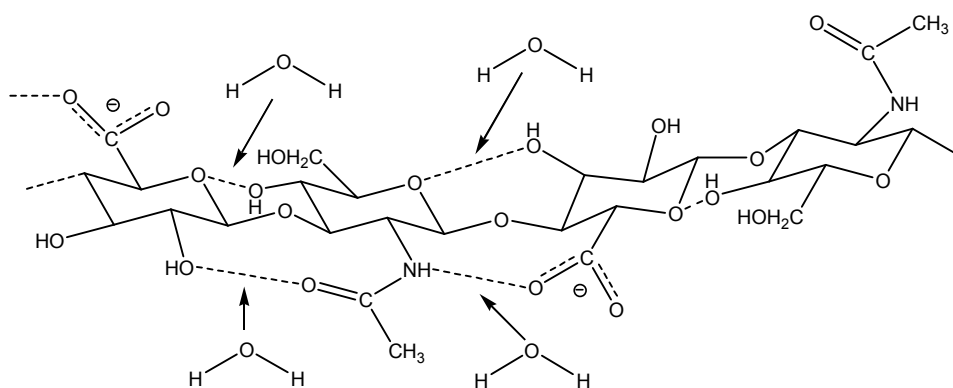


Abbildung 6.2: Mögliche Konfiguration einer Tetrasaccharideinheit der Hyaluronsäure in wässriger Lösung.

Die Wechselwirkung zwischen der Carboxylatgruppe und der Acetamidogruppe führen zu einer Faltung des Moleküls, wobei in wässriger Lösung eine Aufweitung dieser Faltung durch das Eindringen von Wassermolekülen die Folge ist. Dabei lagern sich die Wassermoleküle zwischen die Carboxylat- und die Acetamidogruppe, woraufhin diese über Wasserstoffbrückenbindungen mit den beiden funktionellen Gruppen gebunden werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten NMR-Messungen werden zum größten Teil bei einer Temperatur von 60°C durchgeführt, weil über die damit verbundene Verringerung der Viskosität der Probenlösung eine Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses erreicht wird. Die erhöhte Temperatur bewirkt eine gesteigerte Beweglichkeit der Moleküle, womit die Abnahme der Viskosität einhergeht und zu einer Steigerung der spektralen Auflösung führt. Dieses Verfahren bewährte sich bereits bei den Untersuchungen von Emmerichs et al. und Furth et al. [20, 97]. Durch den Vergleich mit den Ergebnissen von Napier et al. sowie von Sicińska et al. stellte sich heraus, dass die Signalzuordnung oberhalb von 37°C problematisch ist, denn die Lage der ^{13}C -Resonanzen im NMR-Spektrum unterscheiden sich von den Literaturwerten [90, 92]. Die Ergebnisse von Sicińska et al. bestätigten den Verdacht, dass der Verschiebungseffekt durch den Temperaturunterschied ausgelöst wird. Sicińska et al. haben in ihrer Arbeit, in der NMR-Messungen zwischen 4°C und 37°C vollzogen wurden, einen Temperatureinfluss auf den Verschiebungseffekt nachgewiesen. Um den Einfluss der Temperatur genauer zu untersuchen und eine Signalzuordnung bei der höheren Temperatur zu ermöglichen, wird eine inverse ^1H - ^{13}C -Korrelationsmessung (HSQC) mit einem DRX-400-NMR-Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Die Annahme, dass es sich bei der Signalverschiebung um einen temperaturabhängigen Effekt handelt, wird dadurch bestätigt. Dieser Effekt wird auf die erhöhte Beweglichkeit der Makromoleküle bei höheren Temperaturen zurückgeführt. Diese Annahme wird durch die Untersuchungen von Toffanin et al., welche ebenfalls Abweichungen zu den Ergebnissen von Sicińska et al. beschreibt, erhärtet [106]. Bei diesen NMR-Untersuchungen wurden aus nur wenigen Saccharidbausteinen bestehende Hyaluronatfragmente vermessen, welche wegen ihrer geringen Molmasse zu einer geringen Viskosität in wässriger Lösung führen. Die Bedingungen von dieser Arbeit und der von Toffanin et al. sind nahezu vergleichbar, da in dieser Arbeit durch die Erhöhung der Temperatur eine Abnahme der Viskosität und damit einhergehend eine Zunahme der Beweglichkeit der Moleküle erfolgt. So ist es zu erklären, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Positionen der ^{13}C -Resonanzen mit denen von Toffanin et al. nahezu übereinstimmen.

6.1.5 Xanthan

Das verzweigte und geladene Heteropolymer Xanthan weist, wie auch schon das Dextran und die Hyaluronsäure, ein aus Saccharideinheiten aufgebautes Rückgrad auf. Es besteht aus β -1,4- glycosidisch miteinander verknüpften Glucosemolekülen, wobei an jedem zweiten Glucosering die Benztraubensäure einer Seitenkette, welche aus β -D-Mannose, β -1,4-D-Glcuronsäure, α -1,2-D-Mannose und einer endständigen Pyruvatgruppe besteht, ketalartig gebunden ist. Die endständigen Pyruvatgruppen beeinflussen die physikalischen Eigenschaften des Xanthans deutlich. Beispielsweise beschreiben Candia et al., dass ein Anstieg der Viskosität einer wässrigen Xanthanlösung mit einem Anstieg der Pyruvatkonzentration einhergeht ^[107]. Es wird angenommen, dass das Gegenion (Natrium) zur Kompensation der sich abstoßenden negativen Ladungen der Pyruvatgruppen und darüber hinaus zur Bildung von intermolekularen Wechselwirkungen führt. Dabei kann man sich vorstellen, dass dies ähnlich wie beim Calcium(II)alginat zur Entstehung von sogenannten Verknüpfungspunkten beiträgt, welche durch die Pyruvatgruppen komplexiert werden ^[38]. Auf Grund der Neutralisation der negativen Ladung durch die Gegenionen können sich die Moleküle bei der Überschreitung der kritischen Konzentration deutlich annähern, wodurch es dann zu Polymer-Polymer-Verhakung (Entanglements) kommt. Dies dient auch als Erklärung dafür, dass das Xanthan, im Vergleich zur Hyaluronsäure und dem Dextran, ein niedrigeres Löslichkeitsprodukt aufweist. So kommt es bei Konzentrationen größer als 20 mg/mL zur Bildung eines Niederschlags. Die Aktivität der Pyruvatgruppen, welche zu den starken Wechselwirkungen des Xanthans untereinander führt und so eine Agglomeration des Polymers zur Folge hat, erklärt, dass die Ausfällungskonzentration beim Xanthan deutlich niedriger ist als bei den anderen beiden in dieser Arbeit verwendeten Polymeren. Das kommerzielle Xanthan weist eine Molmasse von $2,9 \cdot 10^6$ g/mol auf und besitzt somit die größten Moleküle von den drei untersuchten Polysacchariden. Wie schon die Hyaluronsäure weist das Xanthan ebenfalls eine exzellente Wasserbindungsfähigkeit auf. Durch die starken intramolekularen bzw. intermolekularen Wechselwirkungen zeigt das Xanthan, wie auch die Hyaluronsäure, eine äußerst kompakte sowie stabile Form im festen Zustand auf. Auch hier spielen die auftretenden Wasserstoffbrücken eine wesentliche Rolle. In der Arbeit von Moorhouse et al., in der die Struktur des Xanthans im festen Zustand mittels Röntgenbeugung bestimmt werden sollte, wird die Strukturaufklärung auf diesem Weg als äußerst schwierig eingestuft ^[108]. Trotzdem beschreiben die Autoren in Kombination mit energetischen Betrachtungen eine mehrfache, rechtshändige Helixstruktur des Xanthans im festen Zustand. Die Molekülstruktur des Xanthans im wässrigen Lösung ist ebenfalls noch nicht eindeutig

aufgeklärt, aber es wird ein Zusammenhang zwischen der Ordnung des Xanthanmoleküls und der Temperatur in der Literatur beschrieben ^[109, 110]. Dort ist sowohl eine Stabilisierung einer Einfachhelix als auch einer Doppelhelix bei niedrigen Temperaturen beschrieben. Für eine Temperaturerhöhung wird ein Übergang von einer geordneten Doppelhelix in eine ausgeweitete, dimere Knäuelstruktur mit teilweise geordneten Regionen durch Lui et al. postuliert. Dabei wird vermutet, dass die geordneten Regionen durch Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem Rückgrad des Xanthans herrühren ^[111]. Wie schon bei der Hyaluronsäure führen auch beim Xanthan die Solvatisierungsvorgänge in wässriger Lösung zu einer Aufweitung der Molekülstruktur, was den Grund für die Änderung der Reibungseigenschaften der wässrigen Lösung und somit der Viskosität darstellt. Somit kann eine Beziehung zwischen dem hydrodynamischen Volumen der Xanthanteilchen und der molaren Masse festgestellt werden. In der Dissertation von G. Furth wurde die Abhängigkeit der Viskosität der wässrigen Polymerlösung und der Molmasse näher untersucht. Dabei wird für unabgebautes Xanthan die Molekülstruktur eines vollständig durchspülten Knäuels in ausgeweiteter Form festgestellt. Für verschiedene Abbaustufen des Xanthans in wässriger Lösung wird dort eine Abnahme der Viskosität parallel zur Abnahme der Molmasse beobachtet ^[97]. Die Molmassenreduktion führt somit zu einer Dichtezunahme des Knäuels. Für 3 h abgebautes Xanthan wird so eine Molekülstruktur von einem nur teilweise durchspülten Knäuel mit eindeutig höherer Dichte nachgewiesen. Bei längeren Abbauezeiten verdichten sich die Knäuel immer weiter, so dass sich die Struktur der gelösten Moleküle immer mehr einer Kugelsymmetrie annähert ^[97]. Dabei nimmt die Dichte bei vergleichbarer Molmasse weniger stark zu als bei einem neutralen Polymer, wie z.B. Dextran. Der Grund für diesen Effekt ist, dass sich sowohl die negative Ladung der Pyruvatgruppen, als auch die der Carboxylatgruppen des Natriumsalzes des Xanthans gegenseitig abstoßen und so zu einer zusätzlichen Aufweitung des Xanthans führen, was bei dem ungeladenen Dextran nicht auftritt. Eine weitere Bestätigung für diese makroskopische Struktur sowie für die resultierenden Wechselwirkungen lieferten die Viskositätsmessungen von wässrigen Xanthanlösungen bei variierender Schergeschwindigkeit in der Dissertation von G. Furth. Dort zeigte sich, dass bei Xanthan eine Abnahme der Viskosität mit zunehmender Schergeschwindigkeit auftrat, was wiederum bei dem ungeladenen Dextran nicht beobachtet werden konnte ^[97]. Der Grund für die Viskositätsabnahme bei Xanthan liegt darin, dass eine Ausrichtung der Polymerfasern entlang der Strömungsrichtung stattfindet, welche typischerweise dem pseudoplastische Verhalten für Polymere entspricht. Dementsprechend müsste z.B. das über 3 h abgebaute Xanthan nahezu als Gauß-Kette vorliegen. Somit weicht

die Molekülstruktur von der idealisierten Kugelform ab, welche die Grundlage der Beschreibung der Viskosität einer newtonschen Flüssigkeit darstellt. Dies weist deutlich auf die Richtigkeit der berechneten Struktur des Xanthans in wässriger Lösung.

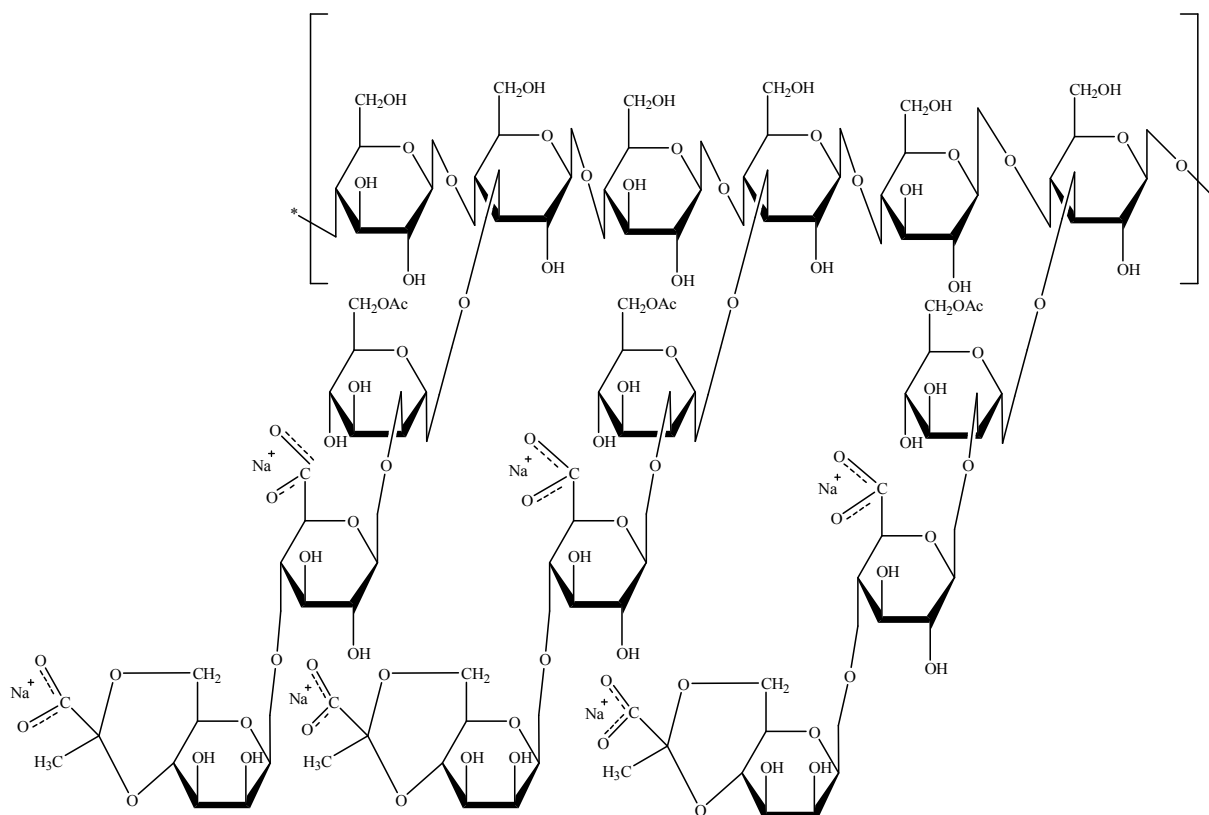


Abbildung 6.3: Ausschnitt aus berechneten Molekülstruktur des Xanthans.

Die NMR-Messungen werden, wie schon bei der Hyaluronsäure, bei einer Temperatur von 60°C durchgeführt, um auf Grund der dadurch verringerten Viskosität der wässrigen Xanthanlösung eine Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses zu erreichen. Wie frühere ^{13}C -NMR-Messungen gezeigt haben, reicht für Xanthan eine Konzentration von 16 mg/mL bei einer Temperatur von 60°C nicht aus, um aussagekräftige ^{13}C -NMR-Spektren zu erhalten. Aus diesem Grund werden die Makromoleküle des Xanthans mit Hilfe von Ultraschall partiell depolymerisiert, um einen Anstieg der Viskosität bei zunehmender Xanthankonzentration genauso wie eine Abnahme der Mobilität der Polymerketten zu vermeiden. Dadurch wird eine verbesserte Löslichkeit der Xanthanfragmente sowie eine entsprechend verbesserte Beweglichkeit der Moleküle in der Lösung erreicht. Ein weiterer positiver Effekt dieser Maßnahme ist, dass das Signal-Rauschverhältnis, ebenso wie die spektrale Auflösung der ^{13}C -NMR-Spektren, entsprechend verbessert wird. Die erhaltenen Spektren zeigen deutlich, dass die verwendete Degradationsmethode ausreichend selektiv bezüglich der glykosidischen

Trennung ist, so dass nur die Bindungen zwischen den Glucoseeinheiten des Xanthanrückgrades gespalten werden und es nicht zu einer Abspaltung von Seitenketten kommt, was das physikalische Verhalten den Xanthans deutlich ändern würde.

6.2 Wechselwirkungen zwischen Polysacchariden und Schwermetallkationen

Das Alginat, welches ein wesentlicher Bestandteil des Biofilms von *Pseudomonas aeruginosa* ist, weist eine außerordentliche Affinität zu mehrwertigen Metallionen auf, wie die Ergebnisse von Schürks et al. zeigen ^[38]. Des Weiteren werden von Furth et al. Wechselwirkungen zwischen den zwei Polysacchariden Hyaluronsäure bzw. Xanthan und mehrwertigen Metallkationen nachgewiesen ^[97]. Der Einfluss von Schwermetallkationen auf aquatische Systeme ist von großem Interesse, denn durch die starke Anbindung dieser an die Polysaccharide, tritt eine Aufkonzentration von ökologisch bedenklichem Material auf, was ein erhöhtes Gefahrenpotential birgt. Dies stellt den Grund dar, weshalb weitergehend die Wechselwirkungen von den (Schwer-) Metallkationen Ba^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} und Ni^{2+} mit den Modellpolysacchariden untersucht werden.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, den Bindungsmechanismus zwischen den Polysacchariden und den ausgewählten mehrwertigen Metallkationen genauer beschreiben und verstehen zu können. Zu diesem Zweck werden unter anderem hochauflösende NMR-Spektren der Polysaccharide in Gegenwart der verschiedenen Schwermetallkationen aufgezeichnet. Das Spektrum sollte sich bei einer koordinativen Bindung zwischen einem Monomerbaustein bzw. zwischen funktionellen Gruppen der einzelnen Bausteine und den Kationen in definierter Weise verändern. Da die Kohlenstoffatome der Polysaccharide keine direkte Bindung mit den einzelnen Metallkationen eingehen besteht die Möglichkeit, dass zwei Änderungen des jeweiligen Spektrums auftreten. Die erste mögliche Änderung ist eine Verschiebung der Signale des Spektrums aufgrund der neuen chemischen Umgebung. Die zweite mögliche Änderung der Spektren, die auftreten kann, ist eine Verbreiterung der betroffenen Signale, die durch die eingeschränkte Beweglichkeit von koordinativ gebundenen funktionellen Gruppen bewirkt wird. Die Linienverbreiterung kann durch den Einsatz einer sogenannten paramagnetischen Sonde in Form von paramagnetischen bivalenten Kationen ergänzt werden. In der Regel wird bei ^{13}C -NMR-Messungen darauf geachtet, dass paramagnetische Verunreinigungen vermieden werden, da sie die Relaxationszeiten verkürzen

und damit die Linien verbreitern. Zusätzlich kann die Gegenwart von paramagnetischen Ionen eine Verschiebung des Signals verursachen. Dieser Effekt lässt sich aber bei der Spektralanalyse auch gezielt einsetzen, da nicht alle Signale eines Moleküls gleichermaßen beeinflusst werden. Eine Signalverschiebung kann durch zwei Arten an Wechselwirkungen hervorgerufen werden, zum einen die Kontaktwechselwirkung und zum anderen die Pseudokontaktwechselwirkung. Für beide wird eine Komplexbildung zwischen dem Substrat und dem paramagnetischen Metallkation vorausgesetzt. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den freien Komponenten und dem Komplex in der wässrigen Lösung ein. Durch die Kontaktwechselwirkung wird im Komplex eine Übertragung der Spindichte des ungepaarten Elektrons auf das Substratmolekül bewirkt. Weil die Spindichteverteilung der beobachteten Kerne unterschiedlich ist, geht man davon aus, dass der Verschiebungseffekt im Molekül ebenfalls unterschiedlich groß sein wird. Die Pseudokontaktwechselwirkung besteht aus einer dipolaren Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Dipolfeld des ungepaarten Elektrons und des beobachteten Kerns. Ein permanentes magnetisches Moment besitzen Ionen, in denen ungepaarte Elektronen vorhanden sind. Ohne ein äußeres magnetisches Feld sind die magnetischen Momente statistisch verteilt und heben sich gegenseitig auf. Wird daran ein äußeres magnetisches Feld angelegt, so richten sich die magnetischen Momente in Feldrichtung aus. Dadurch wird eine Magnetisierung, die gleichgerichtet zu dem äußeren Feld ist, hervorgerufen. Die paramagnetische Suszeptibilität ist dabei unabhängig von der Feldstärke, hängt aber von der Temperatur ab, denn die thermische Bewegung wirkt der Ausrichtung der permanenten Magnete im äußeren Feld entgegen ^[24].

Die Struktur der sich zwischen den Polysacchariden und den Schwermetallkationen einstellenden Komplexen wird unter Zuhilfenahme der konduktometrischen Titration und der Rotationsviskosimetrie näher geklärt. Es besteht die Annahme, dass sich die Struktur des in wässriger Phase befindlichen Polysaccharids durch die kontinuierliche Zugabe von Schwermetallionen verändert. Entsteht dabei eine koordinative Bindung zwischen dem Polymer und den Kationen, so bringt das makroskopische Auswirkungen mit sich. So besteht die Annahme, dass durch die auftretenden Wechselwirkungen zwischen den Polysacchariden und den verwendeten Schwermetallkationen in der wässrigen Lösung eine Änderung der Viskosität bewirkt wird. Durch Emmerichs et al. wurde beobachtet, dass dies mit einer Vernetzung der Polymere mit Kationen durch die Bildung von Netzwerkpunkten einher geht und zu einer Viskositätszunahme führt ^[20]. Des Weiteren existiert die Möglichkeit, dass sich die Teilchendichte durch eine stärkere Faltung des untersuchten Polymers und einer intensiveren intramolekularen Wechselwirkung in Anwesenheit von Metallkationen

vergrößert, was zu einer Viskositätsabnahme führen würde. Außerdem sollten Änderungen in der Molekülstruktur an Hand von AFM-Aufnahmen zu beobachten sein. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass die Wechselwirkungen der Biopolymere mit den Kationen einen diskontinuierlichen Verlauf der Leitfähigkeitstitrations hervorrufen. Dieser nicht kontinuierliche Anstieg der Leitfähigkeit wird wahrscheinlich durch die koordinativen Bindungen zwischen den Polysacchariden und den mehrwertigen Schwermetallionen verursacht. Durch eine auftretende Komplexbildung sind die Ladungsträger in einem elektrischen Feld so lange in ihrer Bewegung eingeschränkt bis sich eine Äquivalenz zwischen den freien Komponenten und den Komplexen während der Titration einstellt. Dies bedeutet, dass bis zu einem Äquivalenzpunkt der Leitfähigkeitsanstieg geringer ausfällt als in einer polysaccharidfreien Lösung. Nach Überschreiten des Äquivalenzpunktes steigt die Leitfähigkeit dann in der üblichen Weise an.

6.2.1 Dextran

Das Dextran, welches als Modellpolysaccharid für ungeladene EPS dient, wird unter dem Einfluss von bi- bzw. trivalenten Kationen beobachtet. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf eventuelle Änderungen der physikalischen Eigenschaften gelegt. Dextran weist ein Rückgrad auf, welches aus glycosidisch verbundenen Glucoseeinheiten besteht. Diese Glucosemonomere weisen Hydroxylgruppen auf, welche am Sauerstoff lokalisierte freie Elektronenpaare besitzen und somit Lewisbasen darstellen. Setzt man diese partiellen negativen Ladungen der positiven Ladung einer Lewissäure in Form eines Kations aus, so wird davon ausgegangen, dass es aufgrund von Coulombschen Kräften zur Anziehung kommt. Diese theoretischen Annahmen werden für trivalente Kationen in der Literatur unterstützt ^[112]. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse von Soares et al, dass die Hydroxylgruppen, die an dem C-2- bzw. an dem C-3-Atom der Monomereinheiten gebunden sind, mit den von Soares et al. untersuchten Lanthanoiden komplexieren ^[113]. Dabei wird gezeigt, dass die Stabilität der Komplexe von Nd^{3+} , über Ce^{3+} nach La^{3+} zunimmt. Durch Mazi et al. wird beschrieben, dass die Viskosität einer 20%igen Dextran-Lösung in einem Konzentrationsbereich bis zu 0,08 mol/L des trivalenten Kations zunächst abnimmt und im Anschluss dran, bis zu einer Konzentration von 0,16 mol/L, wieder ansteigt ^[112]. Nach den Ergebnissen von Hirashima et al. kann an Hand der ermittelten Minima ein stöchiometrisches Verhältnis errechnet werden. Für das beschriebene Polymer/Kation-System beträgt das Polymer/Kation-Verhältnis eins zu eins ^[114]. Für die in dieser Arbeit untersuchten

Schwermetallkationen kann der beschriebene Einfluss auf wässrige Dextranlösungen, wie bei den Lanthanoiden, nicht bestätigt werden. Wie dem Abschnitt 5.2.1 zu entnehmen ist, wird in Anwesenheit sowohl von bi- als auch trivalenten Kationen keine Änderung der Viskosität von den Dextranlösungen beobachtet. Außerdem kann eine Leitfähigkeitsänderung von wässrigen Dextranlösungen in Abhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Kationen, wie sie für die Lanthanoide beschrieben wird, ebenfalls nicht nachvollzogen werden ^[112]. Die Ergebnisse für die in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Leitfähigkeitsmessungen zeigen deutlich, dass ein linearer Verlauf für die mit den hier verwendeten Schwermetallkationen durchgeführten Titrations auftritt, was eindeutig beweist, dass zwischen Dextran und den untersuchten Kationen keine signifikanten Wechselwirkungen auftreten. Der in Abbildung 5.7 dargestellte Leitfähigkeitsgraph von einer Titration von 1,5 mg/mL wässrigen Dextranlösung mit 0,05 mol/L Cobalt(II)acetat-tetrahydrtat-Lösung stellt ein Beispiel für alle durchgeführten konduktometrischen Titrations mit wässrigen Dextranlösungen dar.

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der Literatur zeigt deutlich, dass die Wertigkeit der Kationen eine wesentliche Rolle für die Wechselwirkungen zwischen Kationen und dem neutralen Polysaccharid Dextran spielen muss. Die trivalenten Lanthanoide, welche in der Literatur verwendet wurden, stellen im Vergleich mit den in dieser Arbeit genutzten Metallkationen wesentlich stärkere Lewisäuren dar. Dies verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen mit den freien Elektronenpaaren des Makromoleküls deutlich schwächer ausfallen als erwartet wurde und somit mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden können. Demnach haben diese auch keinen signifikanten Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften des Dextrans. Daraus kann man schließen, dass es in Biofilmen, in denen Dextran als wesentlicher Bestandteil der EPS auftritt, zu keiner bedeutenden Akkumulation von Schwermetallen kommen kann.

Außer der Ladung des Kations muss es noch weitere Faktoren geben, die eine wichtige Rolle bei der Bildung von Wechselwirkungen zwischen Dextran und Kationen spielen. Bei dem trivalenten Chrom(III)-ion sind ebenfalls keine Änderungen der physikalischen Eigenschaften zu beobachten. Vergleicht man die Kationen aus dieser Arbeit mit denen aus der Literatur, so erkennt man einen signifikanten Unterschied im Ionenradius. So ist der Ionenradius der in dieser Arbeit verwendeten Ionen, abgesehen von Ba^{2+} mit 135 pm, deutlich kleiner als 80 pm. Die in der Literatur verwendeten Lanthanoidionen weisen alle einen Ionenradius größer 100 pm auf. Das einzige in der vorliegenden Arbeit verwendete trivalente Kation, das Chrom(III)-ion, weist mit 64 pm einen um fast die Hälfte kleineren Ionenradius auf als das in der Literatur verwendete Lanthan (122 pm). Daraus kann deutlich eine Größenabhängigkeit der

Wechselwirkungen der Ionen abgeleitet werden, wofür auch die oben schon erwähnte Stabilitätsreihe der Lanthanoidenkomplexe spricht ^[112]. Durch die Zuordnung der entsprechenden Ionenradien für die genannten Metalle ist es möglich, eine Zunahme der Komplexstabilität mit steigendem Ionenradius zu postulieren.

Abschließend lässt sich sagen, je größer die Ladung eines Kations ist und je größer dessen Radius ist, umso stärker sind dessen Wechselwirkungen mit Dextran ausgeprägt.

6.2.2 Hyaluronsäure

Die durch Furth et al. erhaltenen Ergebnisse, dass zwischen mehrwertigen Metallkationen und dem Polysaccharide Dextran keine Wechselwirkungen über die Änderung der physikalischen Eigenschaften nachgewiesen werden können (siehe Kapitel 6.2.1), können reproduziert werden ^[97]. Für signifikante Wechselwirkungen zwischen dem Dextran und den untersuchten Metallkationen scheint die Lewisbasizität der Hydroxylgruppen des Dextrans nicht stark genug zu sein. Mit diesem Hintergrund werden wässrige Lösungen des geladenen Polysaccharids Hyaluronsäure in Kombination mit Schwermetallkationen auf Wechselwirkungen untersucht, denn dieses Biopolymer weist, ähnlich wie das Alginat, eine Glucuronatuntereinheit auf. Dabei ist davon auszugehen, dass Wechselwirkungen zwischen den Metallionen und den in dissoziierter Form negativ geladenen Carboxylgruppen auftreten werden, wie sie bei Furth et al nachgewiesen wurden ^[115]. Für das zweite Monomer, dem Glucosamid, aus dem sich eine Hyaluronat-Grundeinheit zusammensetzt, liegen ebenfalls Ergebnisse von Furth et al. vor, die Wechselwirkungen mit der Amidgruppe nachweisen ^[115].

Um die Wechselwirkungen der Schwermetallkationen mit der Hyaluronsäure in wässriger Lösung zu charakterisieren, werden auch hier wieder Leitfähigkeitstitrations, wie sie in Kapitel 4.2 beschrieben sind, durchgeführt. Dabei wird die Leitfähigkeit bei den verschiedenen Messungen in mS/cm bestimmt. Der Verlauf einer exemplarischen Leitfähigkeitstiteration ist an einer über 3h abgebauter Hyaluronsäurelösung mit einer 0,05 mol/L FeCl₂-Lösung in Abbildung 5.2 dargestellt. Weitere Titrationsverläufe sind im Anhang zusammengestellt. Aus den eingesetzten Hyaluronsäurekonzentrationen, welche zwischen 0,5 mg/mL und 3,0 mg/mL liegen, können die dazugehörigen Stoffmengenkonzentrationen berechnet werden, welche in Tabelle 5.2 gezeigt sind. Die ermittelten Äquivalenzkonzentrationen für die verschiedenen untersuchten Schwermetallkationen liegen im Bereich von $2 \cdot 10^{-5}$ – $1,55 \cdot 10^{-4}$ mol. Daraus kann das Kation/Monomerverhältnis bestimmt werden, welches im Mittel bei eins zu fünf liegt. Dies

bedeutet, dass ein Kation mit fünf Monomereinheiten des Hyaluronats wechselwirkt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Hyaluronsäure mit den Metallkationen Wechselwirkungen eingeht, da die Beweglichkeit der einzelnen Ladungsträger in dem von außen angelegten elektrischen Feld gehemmt ist. Diese Hemmung der Beweglichkeit ist klar in Abbildung 5.4 zu erkennen, in der bis zum Erreichen des Äquivalenzpunktes eine Abweichung zum polysaccharidfreien Verlauf zu beobachten ist. Diese Abweichung ist bei den verschiedenen untersuchten Schwermetallkationen unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies weist deutlich daraufhin, dass sich die Komplexe, die sich mit den unterschiedlichen Kationen bilden, in ihrer Stärke unterscheiden. Denn je stärker ein Komplex ist, umso intensiver sind auch die Wechselwirkungen zwischen den Monomereinheiten der Hyaluronsäure und dem jeweiligen Kation. Als Indikator für die Stabilität des Komplexes bzw. der Stärke der Wechselwirkungen dient die Differenz $\Delta\kappa^*$ der Leitfähigkeitsfunktionen in An- und Abwesenheit von Hyaluronat (siehe Abschnitt 4.2). Furth et al. beobachtete eine tendenzielle Steigerung der Stärke des gebildeten Komplexes mit der Zunahme des Ionenradius^[97]. Betrachtet man die in dieser Arbeit untersuchten bivalenten Kationen, so ist, mit Ausnahme von den Ni^{2+} -Ionen, diese Tendenz auch hier zu erkennen. Dies bestätigt die Erkenntnis, die auch für die Wechselwirkungen des Dextrans mit den dreiwertigen Lanthanoiden abgeleitet wurde, denn auch dabei wurde derselbe Zusammenhang zwischen der Stärke der Wechselwirkungen und dem Ionenradius (siehe Kapitel 6.2.1) nachgewiesen.

Es wird davon ausgegangen, dass durch die Bildung solcher Komplexe eine Änderung der Molekülstruktur stattfindet und sich somit die Reibungseigenschaften in der Lösung verändern, was eine Änderung der Viskosität zur Folge hat. Aus diesem Grunde werden rotationsviskosimetrische Titrations durchgeföhrt und deren Verläufe in den entsprechenden Graphen dargestellt. Ein Beispiel für den Verlauf einer solchen rotationsviskosimetrischen Messung ist in Abbildung 5.8 gezeigt, weiteren Messungen sind im Anhang dargestellt. Bei diesen Messungen wird im Gegensatz zu den Ergebnissen von Emmerichs et al. eine Viskositätsabnahme bei gleichzeitiger Konzentrationszunahme der mehrwertigen Schwermetallkationen in einer wässrigen Hyaluronsäurelösung beobachtet^[20]. Dies stellt wiederum eine Bestätigung der Ergebnisse von Furth et al. dar, denn eine Viskositätsabnahme bei gleichzeitiger Konzentrationszunahme der bi- und trivalenten Kationen findet dort ebenfalls statt^[97]. Man nimmt an, dass die zu beobachtende Viskositätsabnahme in dem Ausbleiben einer Vernetzung, wie sie beim Alginat mit bivalenten Kationen auftritt, begründet ist und stattdessen eine Zunahme der intramolekularen Wechselwirkungen resultiert. Die solvatisierten Hyaluronatketten in wässriger Lösung werden durch Wasserstoffbrücken

stabilisiert (siehe Abbildung 6.2) und liegen als statistische Knäuel vor. Es wird angenommen, dass die positiven Kationen durch Coulombsche Wechselwirkungen beeinflusst in die Knäuelstruktur diffundieren und so die Faltung der Hyaluronsäure mitbestimmen. Diese Faltung wird durch eine intensive intramolekulare Verknüpfung der Metallkationen mit den funktionellen Gruppen ausgelöst. Außerdem stoßen sich die über das Hyaluronat verteilten negativen Ladungen nicht weiter ab, da sie durch die positiven Schwermetallionen kompensiert werden. Dies bringt eine Zunahme der Dichte des Knäuels mit sich, was in der Abnahme der Reibung der Polymerketten untereinander nach sich zieht. Die kontinuierliche Abnahme der Viskosität, wie sie in Abbildung 5.8 gezeigt ist, schreitet so lange voran, bis sich ein Gleichgewicht zwischen den Komplexen und den freien Komponenten während der Titration eingestellt hat. Oberhalb dieser Äquivalenzkonzentration wird eine konstante Viskosität beobachtet. Unter Zuhilfenahme dieser Äquivalenzkonzentration und der bei der jeweiligen Messung verwendeten Hyaluronatkonzentration wird die Stoffmengenkonzentration bezogen auf die jeweiligen Polymereinheiten, die mit den Kationen wechselwirken, berechnet. Die so bestimmten Ergebnisse, welche in Tabelle 5.6 gezeigt sind, entsprechen im Wesentlichen denen der Konduktometrie, denn auch hier wird für alle zweiwertigen Kationen annähernd ein Kation-Monomer-Verhältnis von eins zu fünf nachgewiesen. Beim dreiwertigen Chrom kommen auf ein Kation sechs Polymereinheiten, was ebenfalls eine Bestätigung der Ergebnisse der konduktometrischen Titration darstellt.

Dass eine Kontraktion der Hyaluronatmoleküle in Gegenwart von mehrwertigen Kationen sehr wahrscheinlich ist, haben schon die Ergebnisse von Furth et al. gezeigt. Dort wurde der Einfluss auf die Viskosität in Abhängigkeit der Schergeschwindigkeit untersucht, und in Abwesenheit von mehrwertigen Kationen eine Abnahme der Viskosität einer Hyaluronatlösung mit zunehmender Schergeschwindigkeit beobachtet ^[97]. In Anwesenheit von mehrwertigen Kationen blieb diese Viskositätsänderung aus. Polymere und Polyelektrolyte weichen in Lösung in der Regel vom klassischen Newtonschen Verhalten ab, dies geschieht meist durch die Bildung von vollständig durchspülten Knäueln. Die gelösten Polymere werden, bedingt durch die Zunahme der Scherkräfte, immer mehr gestreckt, was eine Ausrichtung parallel zur Strömungsrichtung zur Folge hat. Dies resultiert in einer Abhängigkeit der Viskositäten von den Schergeschwindigkeiten. Die dabei auftretenden Strukturänderungen sind in der Regel reversibel. Da sich die Viskosität der Hyaluronsäure-Lösung in Gegenwart von mehrwertigen Metallkationen nicht verändert, wird dort eine Komprimierung der Knäuelstruktur vermutet ^[97]. Diese wird durch intensive intramolekulare

Wechselwirkungen erklärt, wodurch die Streckung der Moleküle durch die Scherung verhindert wird. Dies stellt eine Bestätigung der Annahmen aus dieser Arbeit dar.

Die in dieser Arbeit durchgeführten AFM-Messungen mit Hyaluronsäure bestätigen ebenfalls die Annahme, dass durch die Bildung der jeweiligen Komplexe eine Änderung in Molekülstruktur stattfindet. Dies ist deutlich in der in Abbildung 5.15 dargestellten AFM-Aufnahme von unabgebauter Hyaluronsäure in Anwesenheit von CuCl_2 zu erkennen, denn in dieser Abbildung sind eindeutig mehr und größere Flächen an Hyaluronsäure zu erkennen als in der Abbildung 5.12, in der eine AFM-Aufnahme von unabgebauter Hyaluronsäure ohne Schwermetallzugabe gezeigt ist. Dies kommt dadurch zustande, dass sich durch die anwesenden Kationen die einzelnen Hyaluronsäureketten enger verknäueln können und sich außerdem verschiedene Hyaluronsäureeinheiten dichter nähern als ohne Kationen. Dadurch entstehen bei der AFM-Messung Bereiche, die wie nahezu einheitliche Flächen aussehen. Auf Grund der stärkeren Faltung und Verknäuelung der einzelnen Hyaluronsäurestränge sind auch geringere Radien zu erkennen, was unter anderem durch die Zunahme der intermolekularen Wechselwirkungen zu erklären ist. Außerdem ist die Abstoßung der über das Hyaluronat verteilten negativen Ladung durch die Anwesenheit der positiv geladenen Kationen aufgehoben, was ein dichteres Aneinanderlagern des Hyaluronats begründet.

Zur weitergehenden Charakterisierung der durch die verschiedenen physikalischen Methoden nachgewiesenen Wechselwirkungen zwischen der Hyaluronsäure und den verwendeten Metallkationen werden in dieser Arbeit NMR-Untersuchungen durchgeführt. Es wird angenommen, dass die Kationen Ba^{2+} und Ni^{2+} , ähnlich wie die von Furth et al. untersuchten Mangan(II)- und Kupfer(II)-Ionen, mit dem Hyaluronat wechselwirken. Somit sollte man an Hand der Resonanzsignale Informationen über die gebildeten Komplexe erhalten können. Aus diesem Grund werden sowohl hochaufgelöste ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Spektren aufgezeichnet. Als Vorarbeit zu diesen Messungen wird der Einfluss des Ultraschallabbaus des gelösten Polymers auf die NMR-Spektren kontrolliert. Die Ergebnisse zeigen, dass durch den Abbau keine wesentlichen Änderungen in den einzelnen NMR-Spektren auftreten. Vergleicht man die Spektren der reinen Hyaluronsäure mit denen mit Metallkationen, so ist zu erkennen, dass zum Teil leichte Linienverbreiterungen an bestimmten Kohlenstoffatomen der Zuckerringe auftreten. Ein Vergleich dieser Spektren ist in Abbildung 5.28 gezeigt. Eine deutliche Verbreiterung von einzelnen Signalen, wie sie bei Furth et al. gezeigt werden, ist hier nicht zu erkennen. Dort wird vor allem eine starke Beeinflussung der C-5- und C-6-Position gezeigt. Bei dem C-6-Kohlenstoff handelt es sich um den in dissoziierter Form negativ geladenen

Kohlenstoff der Carboxylgruppe und bei der C-5-Position um das direkt benachbarte Kohlenstoffatom^[97]. Es wird dabei davon ausgegangen, dass diese Verbreiterungen durch die direkte Nähe des paramagnetischen Manganions auftreten, welche durch das zusätzliche Magnetfeld des Manganions auftritt. Dieses Magnetfeld strahlt auch auf das C-5-Atom aus und verbreitert so auch dieses Signal. Diese Linienverbreiterungen sind ein Anzeichen für Wechselwirkungen des jeweiligen Kations mit der Carboxylatgruppe des Glucuronats. Sie treten in den NMR-Spektren der hier vorliegenden Arbeit weniger stark auf, was aber nicht heißt, dass keine Wechselwirkungen zwischen dem Hyaluronat und den Ba^{2+} - und den Ni^{2+} -Kationen auftreten. Das bei diesen Kationen auftretende Magnetfeld unterscheidet sich von dem des Mn^{2+} . Es wird davon ausgegangen, dass aus dem selben Grund auch die Resonanzen des Glucosamids weniger stark verbreitert sind als bei den Messungen von Furth et al.. Die stärkste Beeinflussung sollte hier an der C-7-Position stattfinden, denn dabei handelt es sich um den Carbonylkohlenstoff der Amid-Gruppe. Außerdem sollte ebenfalls die benachbarte C-8 Position beeinflusst werden, wobei es sich um die benachbarte Methylgruppe handelt. Im ^1H -NMR-Spektrum ist in Anwesenheit der Metallkationen eine Beeinflussung des Signals der Methylprotonen zu erkennen. Es wird angenommen, dass sich die jeweiligen Schwermetallionen in der direkten Umgebung zum C-7-Kohlenstoff befinden und dort durch das zusätzliche Magnetfeld eine Verbreiterung des Signals bewirkt. Dieses Magnetfeld wirkt sich ebenfalls auf das C-8-Atom sowie auf die Protonen der Methylgruppen aus, was auch dort zu einer Verbreiterung führt. Die NMR-Ergebnisse deuten somit auf Wechselwirkungen der verwendeten Schwermetallkationen mit der Carbonylgruppe des Glucosamids, sowie der Carboxylat- und Carbonylgruppe hin.

Unterstellt man nun die Gültigkeit des bereits für Wechselwirkungen mit einwertigen Kationen veröffentlichten Strukturen des Hyaluronats in fester Form auch in wässriger Lösung, so weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen oktaedrischen Komplex hin, wie er in Abbildung 6.4 gezeigt ist^[99].

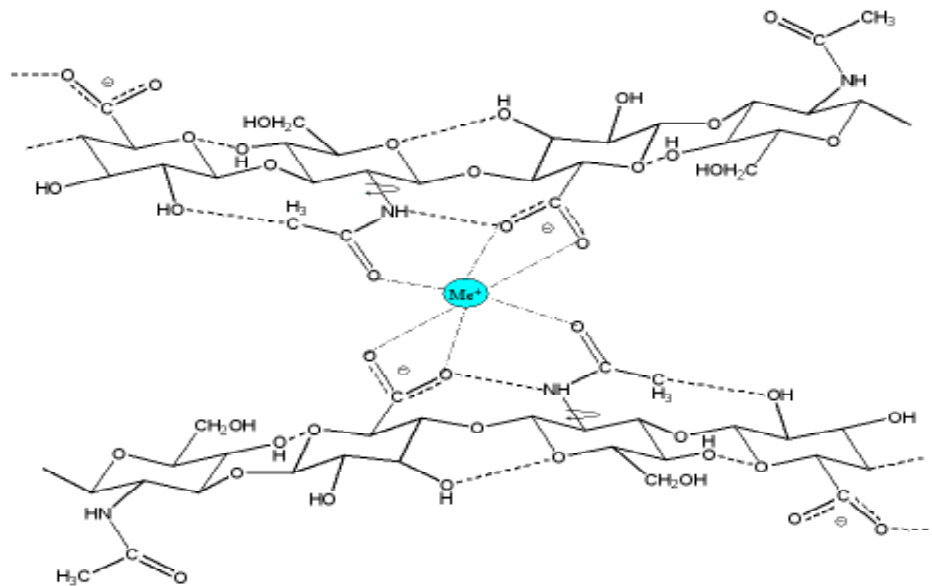


Abbildung 6.4: An Hand der Ergebnisse dieser Arbeit vermutete Struktur eines oktaedrischen Metall-Hyaluronatkomplexes bestehend aus zwei Disaccharideinheiten.

Es ist davon auszugehen, dass dieses Model eines oktaedrischen Komplexes für alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Schwermetallkationen in wässriger Lösung gültig ist. Als Bestätigung dienen die Veröffentlichung von Furth et al. ^[115].

Betrachtet man nun alle in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, so kann man sagen, dass die zum Teil ökologisch relevanten Schwermetallkationen eine besondere Affinität zum Hyaluronat, welches ein wesentlicher Bestandteil vieler Formen der EPS ist, aufweisen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine Akkumulation von mehrwertigen Schwermetallkationen in der EPS-Matrix vorhanden ist. Eine solche Anreicherung von zum Teil toxischem Material kann nicht als unproblematisch betrachtet werden, da es von hieraus leicht in die Nahrungskette gelangen kann. So besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass planktonische Partikel mit einer erhöhten Schwermetallkonzentration durch höhere Organismen aufgenommen werden, was ein unkalkulierbares Risiko für die Nahrungskette darstellt. Die mannigfaltigen Auswirkungen, wie zum Beispiel die Schwächung des Immunsystems oder die Bildung bzw. Ausweitung von Allergien, können sich durch den Verzehr von beispielsweise Fisch oder anderen marinen Lebensformen. Die Wechselwirkungen zwischen dem Hyaluronat und den Schwermetallen können aber auch von Nutzen sein, denn es ist denkbar, dass man die Affinität der Schwermetalle zum Hyaluronat in der Wasseraufbereitung ausgenutzt wird, um Schwermetalle aus dem Wasser zu entfernen. Dies würde eine Verbesserung der Wasserqualität mit sich bringen. Dies könnte in Klärwerken durch stationäre Hyaluronatgele als Filtersystem oder durch Beimengung von

Hyaluronat zu Klärschlämmen vollzogen werden. Abschließend sollte das Filtermaterial durch chemische Behandlung recycelt oder der Klärschlamm entsorgt werden.

6.2.3 Xanthan

Dass prinzipiell Wechselwirkungen zwischen mehrwertigen Metallkationen und geladener EPS auftreten, ist sowohl in der vorliegenden Arbeit an Hand der Untersuchungen an Hyaluronat als auch in den Vorläuferarbeiten bestätigt worden ^{[97],[20]}. Bei all diesen bisher untersuchten Polyelektrolyten handelt es sich allerdings um lineare, unverzweigte Copolymere. Die Besonderheiten von EPS mit geladenen Seitenketten wurden in diesem Zusammenhang bisher nur von Furth et al. mit Hilfe des vom *Xanthomonas campestris* gebildeten Xanthan untersucht. Dieses Heteropolymer Xanthan weist ebenso wie die Hyaluronsäure und das Dextran ein aus Saccharideinheiten aufgebautes Rückgrad auf. Wie beim Dextran besteht dieses aus Glucose-Molekülen, welche über eine β -1,4-glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Dabei wird an jedem zweiten Glucosering die Brenztraubensäure einer Seitenkette ketalartig gebunden. Diese Seitenketten setzen sich aus β -D-Mannose, aus β -1,4-D-Glucuronat, aus α -1,4-D-Glucuronat und einer endständigen Pyruvatgruppe zusammen. Es wird davon ausgegangen, dass Wechselwirkungen zwischen dem Schwermetallkationen und der dissoziierten Form negativ geladenen Carboxylatgruppen des Glucuronats sowie der Pyruvatgruppe nachzuweisen sind.

Um die auftretenden Wechselwirkungen der mehrwertigen Kationen mit dem Xanthan in wässriger Lösung genauer zu charakterisieren, werden auch hier Leifähigkeitstitrations durchgeführt. Die aufgenommene Leitfähigkeit wird mS/cm notiert. Ein beispielhafter Verlauf einer solchen Titration ist in Abbildung 5.5 an Hand einer 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer 0,05 mol/L BaCl₂-Lösung dargestellt. Weiteren Titrationsverläufe sind im Anhang gezeigt. Bei diesen Messungen können an Hand der eingesetzten Xanthankonzentrationen (0,5 mg/mL bis 3,0 mg/mL) Stoffmengenkonzentrationen bezogen auf die jeweiligen Monomereinheiten berechnet werden. Die bestimmten Äquivalenzpunkte liegen im Bereich von $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L bis $1,5 \cdot 10^{-3}$ mol/L für die untersuchten Kationen in Abhängigkeit von der Xanthankonzentration. Dies bedeutet, dass die Verknüpfung der Schwermetallionen in einem Verhältnis von einem Kation zu zwei Monomereinheiten des Xanthans erfolgt. Betrachtet man die im Laufe dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, so wird davon ausgegangen, dass alle untersuchten Kationen mit dem Xanthan wechselwirken. Unter anderem tritt hier, wie auch bei der Hyaluronsäure, auf Grund der Wechselwirkungen eine Hemmung der Beweglichkeit

der Ladungsträger in dem angelegten elektrischen Feld auf. Dies wird in Abbildung 5.5 deutlich, in der bis zum Erreichen des Äquivalenzpunktes eine Abweichung zum polysaccharidfreien Verlauf beobachtet werden kann. Dabei wird für jedes untersuchte Schwermetallkation ein charakteristischer Verlauf der Diskontinuität in Abhängigkeit von der Xanthankonzentration beobachtet. Dieser ist wie beim Hyaluronat von der Wechselwirkungsaktivität zwischen dem jeweiligen Kation und dem Xanthan abhängig. Die Komplexstabilität wird in Form der Differenz $\Delta\kappa^*$ der Leitfähigkeitskurven in Anwesenheit und in Abwesenheit von Xanthan bestimmt. Die Ergebnisse der konduktometrischen Titration von Xanthanlösungen (Kapitel 5.1.3) zeigen, dass, wie schon bei der Hyaluronsäure, ein Anstieg der Wechselwirkungen in der Regel mit der Zunahme der Ionenradien einhergeht. Es wird auch hier angenommen, dass die Bildung solcher Komplexe, wie auch schon bei dem Hyaluronat (Kap. 6.2.3), eine Änderung der Molekülstruktur nach sich zieht, so dass sich die Reibungseigenschaften der Lösung verändern und in diesem Zusammenhang deren Viskosität. Diese Annahme wird im Zusammenhang mit dreiwertigen Metallionen auch in der Literatur diskutiert. Rodd et al. zeigen im Rahmen ihrer Untersuchungen eine Zunahme der Viskosität nach der Zugabe von Aluminium(III) ^[116]. Wird die kritische Konzentration überschritten, so wird von Shu et al. eine Gelbildung beobachtet ^[117]. Allerdings ist der Mechanismus, der dieser Gelbildung zu Grunde liegt, bis jetzt nicht aufgeklärt. Um den Verlauf dieser Gelbildung weitergehend zu ergründen, wurden kinetische Untersuchungen in Gegenwart von Chrom(III)ionen mit Xanthanlösungen durchgeführt ^[118]. Hansen et al. beobachtet in seinen ¹H-NMR-Studien in Anwesenheit des paramagnetischen Kations einen Einfluss auf die Spin-Gitter-Relaxation, welche auf eine Zunahme der Viskosität durch die Wechselwirkung von Xanthan mit dem dreiwertigen Metallion zurückgeführt wird, weil das Kation eine intermolekulare Vernetzung begünstigt. Eine ähnliche Vernetzung wird für wässrige Alginatlösungen in Anwesenheit von bivalenten Kationen postuliert ^[20]. Dabei wird angenommen, dass diese Metallionen Netzwerkpunkte ausbilden, über welche eine intermolekulare Verbrückung möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit werden rotationsviskosimetrische Titrations durchgeföhrt, um eine Änderung der Viskosität von Xanthanlösungen in Anwesenheit von bivalenten Kationen zu betrachten. Ein exemplarischer Verlauf ist in Abb. 5.5 am Beispiel des Xanthans mit Barium(II) dargestellt. Weiteren Titrationsverläufe sind im Anhang aufgeföhrt. Die Untersuchungsergebnisse (siehe Abschnitt 5.1.3) zeigen, dass bei den untersuchten Schwermetallkationen, abweichend von den Ergebnissen von Emmerichs et al. ^[20], eine Abnahme der Viskosität bei gleichzeitiger Konzentrationszunahme der zweiwertigen Kationen in einer wässrigen Xanthanlösungen zu

beobachten ist. Es wird dabei davon ausgegangen, dass eine Vernetzung, wie sie beim Alginat in Kombination mit zweiwertigen Kationen beobachtet wird, ausbleibt und aus diesem Grund eine Zunahme der intramolekularen Wechselwirkungen resultiert.

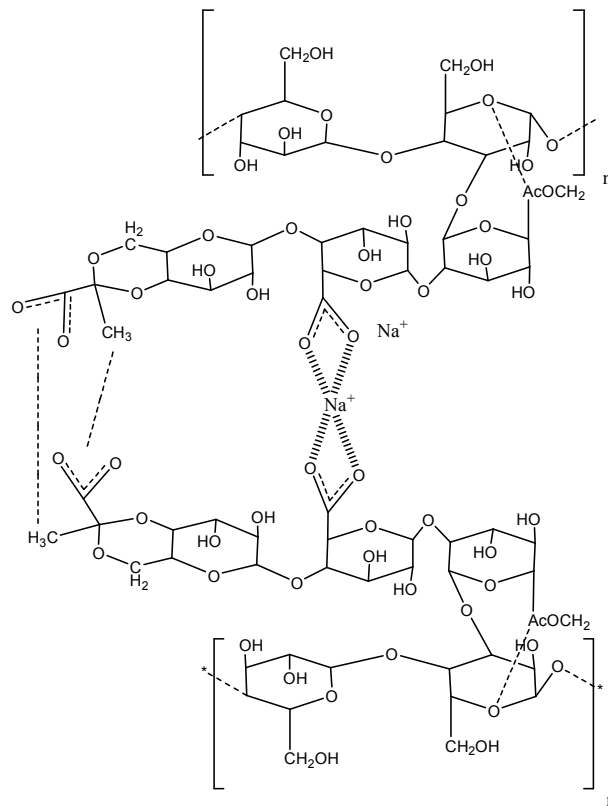


Abbildung 6.5: Schematische Darstellung einer möglichen Struktur der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung des Natriumsalzes von Xanthan in wässriger Lösung ^[119].

Tako et al. postuliert mit seiner Struktur zweier Pentasaccharideinheiten von Xanthan in wässriger Lösung, dass die Doppelhelices in wässriger Lösung über Wasserstoffbrücken stabilisiert werden und als statistische Knäuel vorliegen ^[119]. Es wird angenommen, dass die bivalenten, positiven Ladungsträger durch Coulombsche Wechselwirkungen in die Knäuelstruktur diffundieren und so die einwertigen Natriumionen verdrängen. Durch das Eindringen der zweiwertigen Metallkationen wird die Faltung des Polyelektrolyten begünstigt. Durch intensive Wechselwirkungen zwischen den Kationen und den Carboxylatgruppen der Seitenketten wird diese Faltung ausgelöst. Außerdem werden die negativen Ladungen entlang der Xanthanketten durch die Schwermetallkationen kompensiert, so dass die Abstoßung der negativen Gruppen untereinander aufgehoben wird. Dies zieht eine Dichtezunahme des jeweiligen Knäuels nach sich, was zu einer entsprechenden Abnahme der Reibung der Polymerketten untereinander führt. Die daraus resultierende Abnahme der Viskosität (siehe Abbildung 5.9) schreitet kontinuierlich voran, bis sich ein Gleichgewicht

zwischen den freien Komponenten und den gebildeten Komplexen während der Titration einstellt. Die Viskosität bleibt oberhalb dieser Äquivalenzkonzentration konstant. Unter Zuhilfenahme der Äquivalenzkonzentration und der jeweiligen verwendeten Xanthankonzentration kann das Kation-Monomereinheitenverhältnis berechnet werden. Die Ergebnisse der Viskositätsmessungen entsprechen im Wesentlichen denen der konduktometrischen Titrations (siehe Tabelle 5.9), denn auch hiernach geht ein Kation mit zwei Monomereinheiten Wechselwirkungen ein.

Die in dieser Arbeit durchgeführten AFM-Messungen mit Xanthan zeigen, wie schon bei den Messungen mit Hyaluronsäure, dass sich durch die Zugabe von Schwermetallkationen die Molekülstruktur des Xanthans ändert. Dies ist deutlich zu erkennen, wenn man die Abbildung 5.17 von über drei Stunden abgebautem Xanthan ohne Schwermetallkationen mit der Abbildung 5.19 von über drei Stunden abgebautem Xanthan mit 0,002 mol/L BaCl_2 vergleicht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die einzelnen Molekülstränge in Abbildung 5.19 dichter aneinander liegen als in Abbildung 5.17. Auch hier liegt es darin begründet, dass sich die einzelnen Xanthanmoleküle durch die anwesenden Kationen enger verknäueln und sich außerdem getrennte Xanthaneinheiten dichter nähern können als ohne Kationen. Auf Grund der stärkeren Faltung und Verknäuelung der einzelnen Xanthanstränge sind auch hier geringere Radien zu erkennen, was unter anderem durch die Zunahme der intramolekularen Wechselwirkungen zu erklären ist. Außerdem ist, wie schon bei der Hyaluronsäure, die Abstoßung der über das Xanthan verteilten negativen Ladung durch die Anwesenheit der positiv geladenen Kationen aufgehoben, was ein dichteres Aneinanderlagern des Xanthans ermöglicht.

Um diese nachgewiesenen Wechselwirkungen genauer zu charakterisieren, werden wie auch schon bei der Hyaluronsäure, mit dem Xanthan NMR-Untersuchungen durchgeführt. Auch hier wird angenommen, dass die Kationen Ba^{2+} , Ni^{2+} und Cr^{3+} ähnlich wie die von Furth et al. untersuchten Mangan(II)- und Kupfer(II)-Ionen mit dem Xanthan wechselwirken. Somit sollte man auch in diesem Fall an Hand der Resonanzsignale Informationen über die gebildeten Komplexe erhalten können. Aus diesem Grund werden sowohl hochauflösende ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Spektren aufgezeichnet. Als Vorarbeit zu diesen Messungen wird, wie auch schon beim Hyaluronat, der Einfluss des Ultraschallabbaus des gelösten Polymers auf die NMR-Spektren kontrolliert. Dies zeigt, dass durch den Abbau per Ultraschall keine wesentlichen Änderungen in den einzelnen NMR-Spektren auftreten, wie es auch schon beim Hyaluronat der Fall war. Es tritt nur in einzelnen Abbaustufen ein Essigsäurepeak auf,

welcher von einem bakteriellen Abbau herrührt. Dieser kann durch unsauberes Arbeiten auftreten.

Vergleicht man die Spektren des Xanthans ohne Schwermetallkationen mit solchen in Gegenwart von Metallkationen, so ist zu erkennen, dass auch hier zum Teil leichte Linienverbreiterungen auftreten. Ein Vergleich dieser Spektren ist in Abbildung 5.30 dargestellt. Die aufgenommenen Messungen bestätigen die Vermutung, dass die Carboxylgruppe der Pyruvatgruppe Wechselwirkungen mit den mehrwertigen Kationen eingeht, denn es werden für drei Resonanzen der Pyruvatgruppe eine Linienverbreiterung detektiert. Für das C-1-Signal des Kohlenstoffs der in dissoziierter Form negativ geladenen Carboxylgruppe ist dieser Effekt mit am stärksten ausgeprägt. Des Weiteren tritt eine Verbreiterung am direkt benachbarten Kohlenstoff, dem C-2-Kohlenstoff, auf. Außerdem kann eine Verbreiterung für den Kohlenstoff der Methylgruppe detektiert werden, welche ebenfalls an den C-2-Kohlenstoff der Pyruvatgruppe konvalent gebunden ist. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Schwermetallkationen und der negativ geladenen Carboxylgruppe der Pyruvatgruppe auftreten. Die Metallionen befinden sich in direkter Nähe zum Carboxylkohlenstoff und verursachen aufgrund des zusätzlichen Magnetfeldes eine starke Verbreiterung des Signals. Dieses Magnetfeld strahlt auch auf das C-2-Atom sowie auf den Kohlenstoff der Methylgruppe aus und verbreitert somit auch diese Signale. Eine Verbreiterung des Signals der Methylpropane ist aus diesem Grund ebenfalls im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 2.29) zu beobachten. Dies begründet die Annahme, dass sich die jeweiligen Metallionen in der unmittelbaren Umgebung zum Methylkohlenstoff befinden und dort durch das zusätzliche Magnetfeld eine Verbreiterung des Signals verursachen. Weitere Einflüsse auf die Linienbreite bzw. auf die Intensitäten sind in den ^{13}C -NMR-Spektren nicht zu erkennen. Die in dieser Arbeit erhaltenen NMR-Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse ^[120] und weisen eindeutig auf Wechselwirkungen der untersuchten Schwermetallkationen mit der Carboxylgruppe der Pyruvatgruppe hin.

Berücksichtigt man alle bisher diskutierten Ergebnisse, so kommt man zu dem Schluss, dass die von Tako et al. vorgeschlagene Komplexstruktur für einen Calcium(II)-Xanthan-Komplex (siehe Abbildung 6.6), für die in dieser Arbeit untersuchten Komplexe nicht plausibel ist.

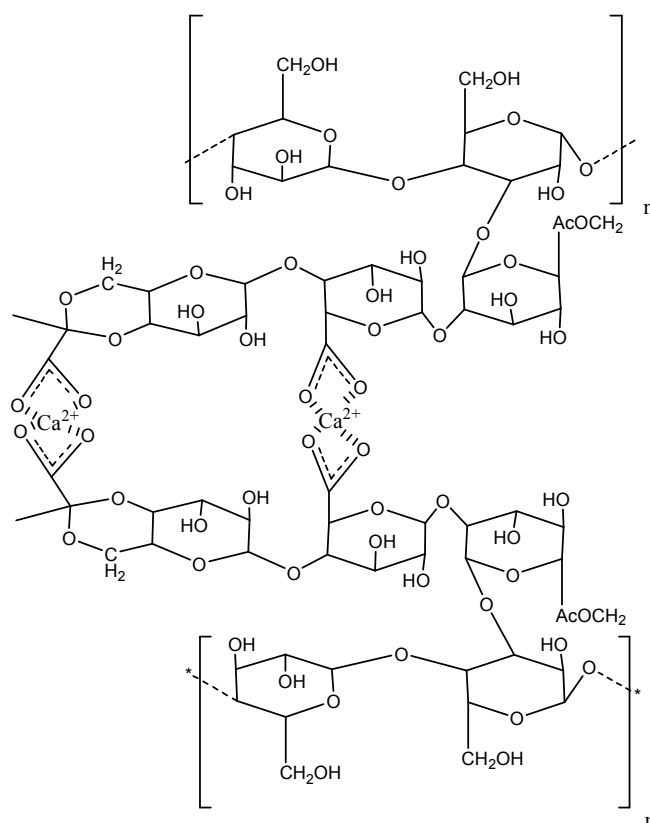


Abbildung 6.6: Schematische Darstellung einer von Tako et al. vorgeschlagenen Struktur für einen Calcium(II)-Xanthan-Komplex in wässriger Lösung ^[119].

In der gezeigten Abbildung sind Wechselwirkungen zwischen den Carboxylatgruppen der Pyruvatgruppe sowie des Glucuronats zu erkennen. Dies trifft aber für die Ergebnisse dieser Arbeit nicht zu, da die NMR-Ergebnisse ausschließlich Wechselwirkungen zwischen der Carboxylatgruppe der Pyruvatgruppe nachweisen. Des Weiteren müsste man für diesen gezeigten Komplex ein Kation/Monomerverhältnis von eins zu eins erhalten, was nicht der Fall ist.

Sowohl die Ergebnisse der konduktometrischen Titration, als auch der rotationsviskosimetrischen Messungen weisen eindeutig ein Verhältnis von eins zu zwei nach. In Abbildung 6.7 ist eine schematische Darstellung eines Komplexes gezeigt, in der die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse berücksichtigt sind. Dabei wird davon ausgegangen, dass die verschiedenen Metallionen jeweils über die Acetylgruppe und Carboxylatgruppen der Glucuronate oktaedrisch koordiniert sind. Diese Glucuronate sind Teile zweier Seitenketten und gehören jeweils zu einer benachbarten Pentasaccharideinheit. Des Weiteren geht man davon aus, dass ein tetraedrischer Komplex durch die Wechselwirkung von einem bivalenten Kation mit zwei Carboxylatgruppen von gegenüberliegenden Pyruvatgruppen gebildet wird. Dieser Bindungsmechanismus, wie er hier für die Bildung eines tetraedrischen

Chelatkomplexes geschildert wird, gilt wahrscheinlich für alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten bivalenten Metallionen gleichermaßen.

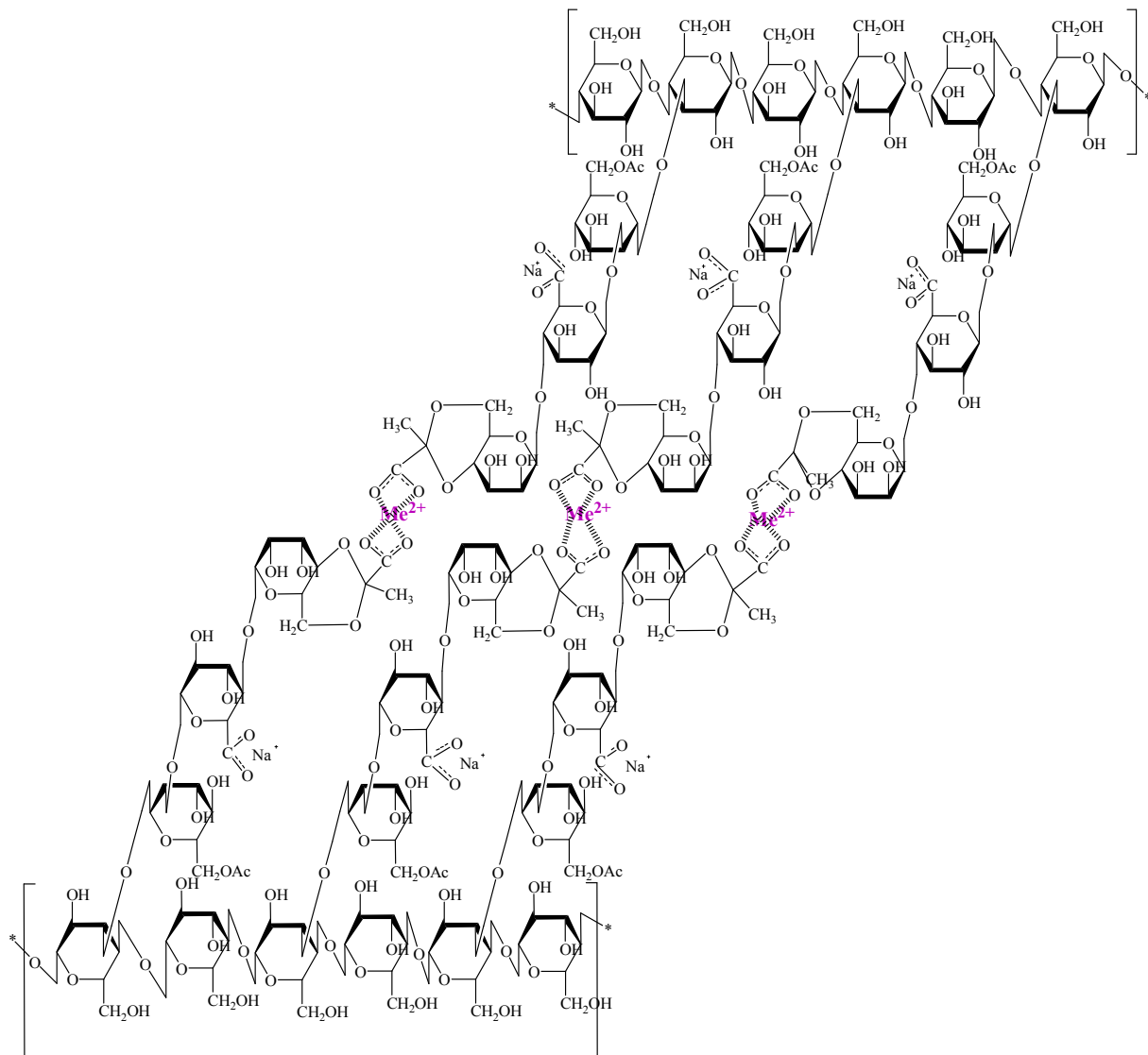


Abbildung 6.7: Schematische Darstellung einer möglichen Struktur der intermolekularen Brückenbindungen von Xanthan mit bivalenten Schwermetallkationen zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen.

Betrachtet man alle gesammelten Fakten, so kann geschlossen werden, dass eine Affinität der hier untersuchten ökologisch relevanten Schwermetallkationen zum Xanthan, wie sie auch für das Hyaluronat beobachtet werden kann, als bewiesen gilt. Die bedeutet entsprechend, dass aquatische Biofilme, mit Xanthan als wesentlichem Bestandteil der EPS, mehrwertige Kationen akkumulieren können. Wie bei Hyaluronat, stellt dies auch hier ein unkalkulierbares Risiko für die Spezies, in dessen Nahrungskette die Schwermetalle eindringen, dar. Ebenso ist auch denkbar, dass die Affinität des Xanthans zu den Schwermetallionen, wie schon beim

Hyaluronat erwähnt, durch den Einsatz in Klärwerken zu einer Verbesserung der Wasserqualität beitragen kann.

7 Zusammenfassung

Da die Struktur eines Biofilms maßgeblich von Wasser und extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bestimmt wird und sich die EPS hauptsächlich aus Polysacchariden zusammensetzen, werden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen an drei ausgewählten Modellpolysacchariden (Dextran, Hyaluronsäure und Xanthan) durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen handelt es sich um physikalische Methoden, welche in Anwesenheit von mehrwertigen Metallkationen (Ba^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} und Ni^{2+}) vollzogen werden. Mit der Verwendung dieser Polysaccharide soll das Verhalten eines Biofilms simuliert werden, um mögliche Wechselwirkungen zwischen den EPS eines Biofilms und den verwendeten Metallen zu charakterisieren. Das ungeladene Dextran wird als Vergleichssubstanz für die geladenen Polysaccharide Hyaluronsäure und Xanthan eingesetzt. Um den Einfluss von Seitenketten bei geladenen Polysaccharidmolekülen zu untersuchen, wird das verzweigte Xanthan mit der linearen Hyaluronsäure verglichen. Mit Hilfe der konduktometrischen und der rotationsviskosimetrischen Titration wird ein Verhältnis von Kation zu Monomereinheiten für die Hyaluronsäure bei zweiwertigen Kationen von ca. eins zu fünf und für dreiwertige Kationen von ca. eins zu sechs am Äquivalenzpunkt bestimmt. Für das Xanthan wird so ein Verhältnis von ca. eins zu zwei für zweiwertige und von ca. eins zu drei für dreiwertige Kationen am Äquivalenzpunkt nachgewiesen. Für Dextran können keine spezifischen Wechselwirkungen mit den untersuchten Kationen nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die bei Xanthan und Haluronsäure in Gegenwart von Kationen auftretenden starken Wechselwirkungen intramolekularer Natur sind und zu einer Dichtezunahme des Moleküls und damit zu einer Abnahme der Viskosität der Lösungen führen. Die rotationsviskosimetrischen Untersuchungen bestätigen diese Annahme, denn hierbei kann eine Abnahme der Viskosität der Lösungen bei gleichzeitiger Erhöhung der Kationenkonzentration beobachtet werden. Strukturspezifische Wechselwirkungen werden für das Hyaluronat sowie für das Xanthan mittels AFM-Spektroskopie und ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen nachgewiesen. Hierbei werden für das Hyaluronat regiospezifische Wechselwirkungen der untersuchten Kationen mit den Amidgruppen sowie mit den Carboxylatgruppen beobachtet. Beim Xanthan weisen die durchgeführten Untersuchungen eine spezifische Wechselwirkung der mehrwertigen Metallionen ausschließlich mit den Carboxylatgruppen der Pyruvatgruppen nach.

Unter Berücksichtigung aller in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse kann eine Affinität der hier untersuchten Metallkationen zu den geladenen Vertretern der EPS nachgewiesen werden.

Für das Hyaluronat bedeutet dies, dass in Gegenwart von mehrwertigen Kationen ein intermolekularer, oktaedrischer Chelatkomplex gebildet wird, dessen Stabilität mit dem Kationenradius zunimmt. Dieser postulierte Komplex ist in Abbildung 7.1 dargestellt.

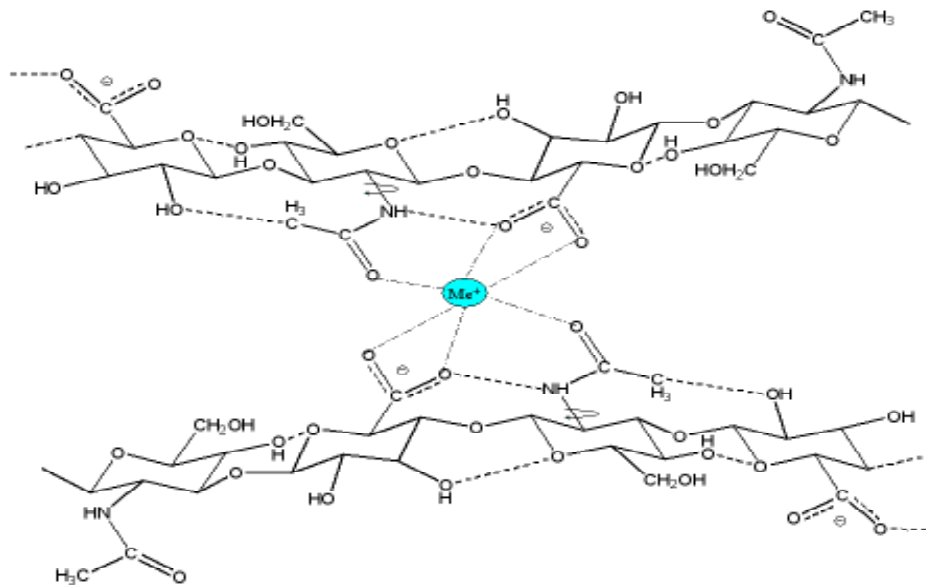


Abbildung 7.1: An Hand der Ergebnisse dieser Arbeit postulierter oktaedrischer Metall-Hyaluronatkomplex bestehend aus zwei Disaccharideinheiten.

Das Xanthan bildet ebenfalls in Gegenwart von mehrwertigen Kationen einen intramolekularen Chelatkomplex, bei dem aber eine tetraedrische Koordination der Kationen angenommen wird. Die Stabilität dieses Komplexes nimmt, wie beim Hyaluronat, ebenfalls mit dem Kationenradius zu. Die in der Literatur formulierte Annahme, dass Xanthan mit den mehrwertigen Kationen sowohl über die Pyruvatgruppen als auch über die Glucuronate wechselwirkt, kann nicht bestätigt werden^[119]. Die erhaltenen Ergebnisse deuten vielmehr auf einen zweiten, in der Literatur beschrieben Komplex hin^[120], bei dem sich die koordinativen Bindungen auf die Pyruvatgruppe beschränken (siehe Abbildung 7.2).

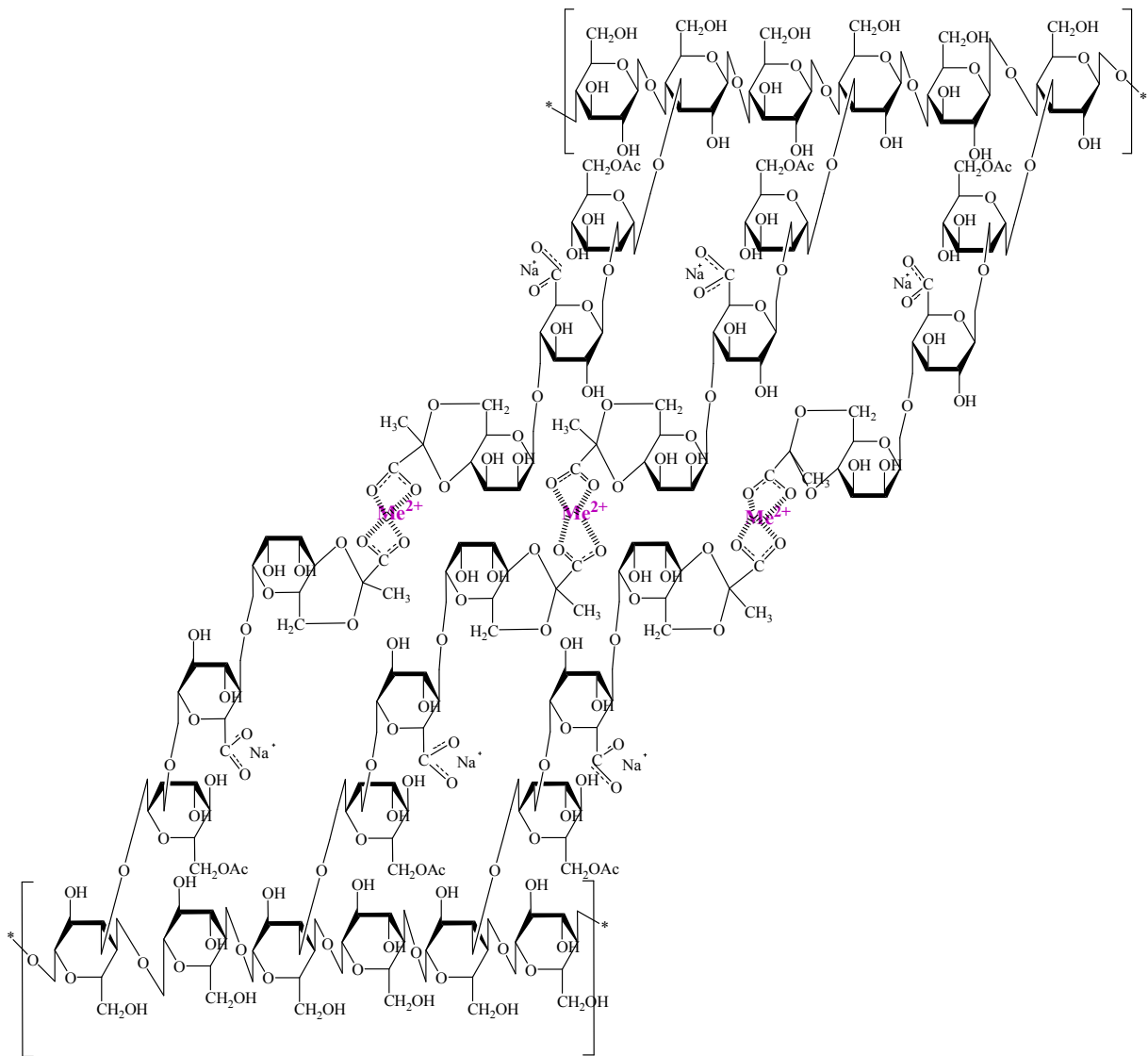


Abbildung 7.2: Struktur des sich durch die Wechselwirkungen zwischen Xanthan und den mehrwertigen Kationen bildenden Komplexes.

8 Literatur

- [1] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, *Annual Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 711
- [2] J. Wingender, T. R. Neu, H.-C. Flemming, *What are bacterial extracellular polymeric substances*, In: J. Wingender, T. R. Neu, H.-C. Flemming (Hrsg.); *Microbial extracellular polymer substances*, Springer, **1999**.
- [3] B. E. Christensen, W. G. Characklis, *Physical and Chemical Properties of Biofilms* In: W.G. Characklis, K.C. Marshall (Hrsg.) *Biofilms*, John Wiley, **1990**.
- [4] J. Wingender, K. E. Jaeger, H.-C. Flemming, *Interaction between Extracellular Polysaccharides and Enzymes* In: J. Wingender, T.R. Neu, H.-C. Flemming (Hrsg.) *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Springer, **1999**.
- [5] D. H. Nies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 51, 730
- [6] S. V. Avery, *Adv. Appl. Microbiol.* **2001**, 49, 111.
- [7] D. J. Eide, *Adv. Microb. Physiol.* **2000**, 43, 1.
- [8] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Vom Wasser* **2000**, 94, 245.
- [9] T. G. Grant, E. R. Morris, A. D. Rees, *FEBS Lett.* **1973**, 32, 195
- [10] N. Emmerichs, J. Wingender, H.-C. Flemming, C. Mayer, *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, 34, 73
- [11] J. W. Schopf, J. M. Hayes, M. R. Walter, *Earth's earliest biosphere*, Princeton University Press, New Jersey, **1983**.
- [12] J. W. Costerton, K. J. Cheng, G. G. Geesey, I. T. Ladd, J. J. Nickel, M. Dasgupta, T. J. Marrie, *Annual Rev. Microbiol.* **1987**, 41, 435.
- [13] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. deBeer, D. Caldwell, D. Korber, G. James, *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 2137.
- [14] A. Duncan, *The ecology of slow sand filters* In: N.J.D. Graham (Hrsg.) *Slow sand filtration: recent development in water treatment technology*, Ellis Horwood Publ., Chichester, **1988**.
- [15] L. Anke, *zum Einsatz eines Airlift Schlaufenreaktors als Drei-Phase-Biowäscher bei der biologischen Abluftreinigung*, Aachen Shaker, **2000**.
- [16] H.-C. Flemming, *Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen*, Oldenburg Verlag, Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft **1994**.
- [17] J. R. W. Govan, *Characteristics of mucoid Pseudomonas aeruginosa in vitro in vivo* In: P. Gacesa, N. J. Russel (Hrsg.) *Pseudomonas infection and alginates*, Chapman and Hall, New York, **1990**.
- [18] G. G. Geesey, *ASM News* **1982**, 48, 9.
- [19] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Chemie in unsere Zeit* **2002**, 36(1), 30.
- [20] N. Emmerichs, *Untersuchung der Wechselwirkungen von Mangan- und Calciumionen mit Alginat von Algen und von verschiedenen mucoiden Stämmen des Bakteriums Pseudomonas aeruginosa*, Dissertation, **2004**.
- [21] H.-C. Flemming, J. Wingender, *Biologie in unserer Zeit* **2001**, 3, 169.
- [22] I. W. Sutherland, *Microbiology* **2001**, 147, 3.
- [23] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organische Chemie*, 2. ed., VCH Verlagsgesellschaft, **1995**.
- [24] *CD Römpp Lexikon Chemie*, 2. ed., Georg Thime Verlag, Stuttgart/New York.
- [25] W. Pilnik, F. Voragen, *Polysaccharide* In: *Ullmann's Enzyklopädie der technischen Chemie*, Vol. Band 19, Verlag Chemie, **1980**.
- [26] G. Franz, *Polysaccharide: Eine Einführung* In: Franz G. (Hrsg.) *Polysaccharide*, Springer Verlag, Berlin, **1991**.

- [27] G. O. Aspinall, *Polysaccharides*, Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford, **1970**.
- [28] R. Kirk, D. Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology 4. Aufl.*, Wiley & Sons, New York, **1993**.
- [29] D. Lattner, *Untersuchung schwacher Wechselwirkungen innerhalb von Biofilmen mittels ^{13}C - NMR - Spektroskopie*, **2003**.
- [30] G. O. Aspinall, *The Polysaccharides In: Molecular Biology - an international series of monographs and textbooks, Vol. 1*, Academic Press, New York, **1982**.
- [31] H.-H. Schwarz, N. Scharnagel, D. Paul, R. D. Behling, *Symplektkompositmembranen zur Stofftrennung. Sonderdruck aus GKSS-Jahresbericht*, GKSS-Forschungszentrum GmbH, Geesthacht, **1992**.
- [32] G. Kramer, H.-M. Buchhammer, K. Lunkwitz, *Colloid and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, 122, 1.
- [33] H. Hübner, *Dissertation: Immobilisierung von Insektenzellen zur Optimierung der Produktbildung und -gewinnung*, TU-Berlin, **1998**.
- [34] C. Wandrey, *Habilitation: Polyelektrolyte - Makromolekulare Parameter und Elektrolytverhalten*, MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung, **1996**.
- [35] W. Nultsch, *Allgemeine Botanik*, Georg Thieme Verlag Stuttgart **1996**.
- [36] A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrod, *Acta Chem. Scand.* **1967**, 21, 691.
- [37] C. Whitfield, *Can. J. Microbiol.* **1988**, 34, 415.
- [38] N. Schürks, J. Wingender, H.-C. Flemming, C. Mayer, *Carbohydr. Res.* **2002**, 30, 105.
- [39] G. Skjak-Braek, H. Grasdalen, B. Larsen, *Carbohydr. Res.* **1986**, 154, 239.
- [40] G. Skjak-Braek, G. F. Zanetti, S. Poletti, *Carbohydr. Res.* **1989**, 185, 131.
- [41] E. D. T. Atkins, P. T. Attwood, M. J. Miles, V. J. Morris, M. A. O'Neill, I. W. Sutherland, *Int. J. Biolog. Macromol.* **1987**, 9, 115.
- [42] J. L. Geddi, I. W. Sutherland, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1994**, 29, 117.
- [43] A. Linker, R. S. Jones, *Natur* **1964**, 204, 187.
- [44] A. Linker, R. S. Jones, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 3845.
- [45] I. Ydens, P. Dubois, *Macromolecules* **2000**, 33, 6713.
- [46] C. S. Pederson, M. N. Albury, *Tech. Bull. Bulletin* **1969**, 824.
- [47] <http://de.wikipedia.org/wiki/Dextrane>, eingesehen am 17.05.2010.
- [48] J. Scott, *Ciba-Found-Symp.* **1989**, 143, 6.
- [49] P. Prehm, *Biochemical Journal* **1983**, 211, 181.
- [50] <http://de.wikipedia.org/wiki/Hyalurons%C3%A4ure>, eingesehen am 17.05.2010.
- [51] P. Toole, *J. Clin. Invest.* **2000**, 106, 335.
- [52] K. Meyer, *Physiol. Rev.* **1947**, 27, 335.
- [53] K. P. Shatwell, I. W. Sutherland, S. B. Ross-Murphy, *Int. J. Macromol.* **1990**, 12, 71.
- [54] D. H. Isaac, *Bacterial polysaccharides In: E.D.T Atkins (Hrsg.) Polysaccharides: Topics in Structure and Morphology*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1985**.
- [55] M. Lopez, A. Ramos-Cormenzana, *J. App. Microbiol.* **2001**, 90, 829.
- [56] M. Schmidt, G. Paradossi, W. Burchard, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1985**, 6, 767.
- [57] K. Okuyawa, S. Arnott, R. Moorhouse, M. D. Walkinshaw, E. D. T. Atkins, C. Wolf-Ullish, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1981**, 141, 411.
- [58] E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom, *Carbohydr. Res.* **1978**, 66, 145.
- [59] M. Yalpani, *Polysaccharides - synthesis, modifications and structure/property relations*, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, **1988**.
- [60] M. E. Hodson, *Environmental Pollution* **2004**, 129, 341.
- [61] J. H. Duffus, *Pure Applied Chemistry* **2002**, 74, 793.
- [62] *Nickel Magazine* **2006**, 21.

- [63] A. F. Holleman, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Vol. 102. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin 2007.
- [64] M. Gavrilescu, *Removal of heavy metals from the environment by biosorption*, Vol. 4, Wiley-VCH Verlag, 2004.
- [65] C. Boutron, *J. Phys.* **2003**, 4, 107.
- [66] S. Fuchs, U. Scherer, T. Hillenbrand, F. Marscheider-Weidemann, H. Behrendt, D. Opitz, in *Forschungsbericht des Umweltbundesamt*, Vol. 54, 2002.
- [67] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie (Zweite Auflage)*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1996.
- [68] D. O. Hummel, W. J. Moore, *Physikalische Chemie (4. Auflage)*, Walter de Gruyter, 1986.
- [69] M. Otto, *Analytische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [70] W.-M. Kulicke, *Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen*, Hüthig & Wepf Verlag, 1986.
- [71] W.-M. Kulicke, C. Clasen, *Viscosimetry of Polymers and Polyelektrolytes*, Springer Verlag, 2004.
- [72] J. Brandrup, E. H. Immergut, *Polymer Handbook*, 3. ed., John Wiley & Sons, New York, 1989.
- [73] B. Vollmert, A. Horvarth, *Grundriß der makromolekularen Chemie*, Vollmert-Verlag, Karlsruhe, 1988.
- [74] M. L. Huggins, *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 2716.
- [75] H.-G. Elias, *Makromoleküle (5. Auflage)*, Hüthig & Wepf Verlag, Basel, 1990.
- [76] <http://www.rheologie.de/PDFs/Messtechnik.pdf>, eingesehen am 23.05.2006.
- [77] *The NanoWizard AFM Handbook*, JPK Instruments, 2005.
- [78] G. Binnig, C. F. Quate, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930.
- [79] H. G. Hansma, J. H. Hoh, *Ann. Rev. Biophys. and Biomat. Struct.* **1994**, 8, 512.
- [80] <http://www3.physik.uni-greifswald.de/method/afm/eam.htm>, eingesehen am 08.06.2010.
- [81] T. M. Balgar, *Laserstrukturierung von Alkylsiloxanmonoschichten auf Siliziumsubstraten im Submikrometerbereich*, 2005.
- [82] A. Perlin, B. Casu, *The Polysacchar.* **1982**, 1, 133.
- [83] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000.
- [84] K. Bock, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1992**, 41, 27.
- [85] M. Bendall, *J. Magn. Res.* **1983**, 53, 144.
- [86] A. Palmer, *J. Magn. Res.* **1991**, 93, 151.
- [87] R. Benn, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 381.
- [88] M. Bosco, *Biopol.* **2000**, 53, 272.
- [89] W. Kulicke, *Makromol. Chem.* **1993**, 194.
- [90] M. A. Napier, *Proc. Natl. Acad. Sci* **1978**, 5, 2261.
- [91] M. Rinaudo, *Macromolecules* **1983**, 16, 816.
- [92] W. Sicinska, *Carbohydr. Res.* **1993**, 242, 29.
- [93] W. Sicinska, *Carbohydr. Res.* **1996**, 286, 151.
- [94] A. Gamini, *Carbohydr. Res.* **1991**, 220, 33.
- [95] D. Horton, *1985* **1985**, 141, 340.
- [96] G. D'Auria, *Biopol.* **2003**, 70, 260.
- [97] G. Furth, *Untersuchung der Wechselwirkungen von ökologisch relevanten bi- und trivalenten Metallionen mit bakteriellen EPS*, Dissertation, 2006.
- [98] K. Huh, *Macromolecules* **2001**, 34, 8657.
- [99] S. Mitra, *J. Mol. Biol.* **1983**, 169, 829.
- [100] K. Haxaire, I. Braccini, M. Milas, M. Rinaudo, S. Pèrez, *Glycobiology* **2000**, 10, 587

- [101] M. K. Cowman, M. Li, E. A. Balazs, *Biophysical Journal* **1998**, 75, 2030.
- [102] L. Wang, *Biopoly.* **1970**, 9.
- [103] A. Darke, E. Finer, R. Moorhouse, D. Rees, *J. Mol. Biol.* **1975**, 99.
- [104] D. Welte, D. Rees, J. Welsh, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 94, 505.
- [105] J. Scott, F. Heatley, *Proc. Natl. Acad. Sci* **1999**, 96, 4850.
- [106] R. Toffanin, *Carbohydr. Res.* **1993**, 245, 113.
- [107] J. Candia, *Biotechnol. Prog.* **1999**, 15, 446.
- [108] R. Moorhouse, S. Arnott, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1977**, 45.
- [109] W. Lui, *Carbohydr. Res.* **1987**, 160, 267.
- [110] G. Muller, *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, 8.
- [111] G. Gravanis, *Carbohydr. Res.* **1987**, 160, 259.
- [112] H. Mazi, B. Zümreoglu-Karan, A. Güner, *J. of Applied Polymer Science* **2001**, 82, 323
- [113] A. De_Soares, A. Alario, *Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **1993**, 31.
- [114] Y. Hirashima, N. Isobe, J. Shiokawa, *J. Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, 59, 25.
- [115] G. Furth, R. Knierim, V. Buss, C. Mayer, *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 42, 33.
- [116] A. Rodd, J. Cooper-White, D. Dunstan, D. Boger, *Ploymer*, **2000**.
- [117] P. Shu, *ACS Symp. Ser* **1989**, 396, 137.
- [118] E. Hansen, T. Lund, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 9811.
- [119] M. Tako, S. Nakamura, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 51, 2919.
- [120] D. Bergmann, G. Furth, C. Mayer, *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 43, 245.

9 Anhang

Anhang A - Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Modell eines aquatischen Biofilms.....	5
Abbildung 2.2:	Darstellung der verschiedenen Wechselwirkungsarten der EPS-Matrix.....	7
Abbildung 2.3:	Häufige Monomerbausteine in Polysacchariden (Teil I).....	9
Abbildung 2.4:	Häufige Monomerbausteine in Polysacchariden (Teil II)	10
Abbildung 2.5:	Darstellung der Nummerierung der sechs C-Atome in einem Monosaccharid (am Beispiel der Hexose).....	11
Abbildung 2.6:	Darstellung der Beweglichkeit der glykosidischen Bindung an drei Beispielen: I) Cellulose, II) Amylose, III) Dextran.....	12
Abbildung 2.7:	Ausgewählte Polyanionen	13
Abbildung 2.8:	Ausgewählte Polykationen	13
Abbildung 2.9:	D- Mannuronat (M) und L- Guluronat (G).....	15
Abbildung 2.10:	Dextran mit α -(1,6)- glykosidischer Hauptkette und einer α -(1,3)- glykosidischer Seitenkette.....	17
Abbildung 2.11:	Hyaluronsäure bestehend aus β (1 \rightarrow 3) D- Glucuronsäure und β (1 \rightarrow 4) N- Acetylglucosamid	18
Abbildung 2.12:	Grundeinheit von Xanthan.....	21
Abbildung 2.13:	Das „Egg-Box“-Modell für Calcium-Alginatgele nach <i>Yalpani</i> ^[59]	23
Abbildung 2.14:	Schwermetallemissionen aus Punkt und diffusen Quellen in den Flussgebieten Deutschlands.....	25
Abbildung 2.15:	Wheatstone-Brücke mit eingebauter Leitfähigkeitsmesszelle ^[67]	26
Abbildung 2.16:	Scherdeformation in einer fließender Flüssigkeit.....	30
Abbildung 2.17:	Scherratenabhängigkeit der Schubspannung bei dilatantem, newtonschem und strukturviskosem Fließverhalten.....	31
Abbildung 2.18:	Statistische Polymerknäuel in Lösung.....	31
Abbildung 2.19:	Ubbelohde- und Ostwald-Viskosimeter ^[76]	35
Abbildung 2.20:	Fallkugelviskosimeter.....	36
Abbildung 2.21:	Brookfield-Viskosimeter	37
Abbildung 2.22:	Rotationsviskosimeter nach Couette und nach Searle ^[76]	38
Abbildung 2.23:	Kegel-Platte-Geometrie ^[76]	38
Abbildung 2.24:	Schematische Darstellung der Messanordnung eines Atomaren Kraft-Mikroskops ^[80]	40

Abbildung 2.25: Schematische Darstellung der Auslenkungsmodi eines Federbalkens, einschließlich der Verschiebung des Laserstrahls auf der Viersegment-Photodiode ^[81]	40
Abbildung 2.26: Schematische Darstellung des Intermittent-Contact-Modes ^[77]	41
Abbildung 2.27: Darstellung der Impulsfolge bei der Breitbandentkopplung ^[83]	43
Abbildung 2.28: Darstellung der Impulsfolge bei einer DEPT-Messung ^[87]	44
Abbildung 2.29: Darstellung der Impulsfolge bei einem HSQC-Experiment ^[86]	44
Abbildung 5.1: Beispiel für die Ergebnisse der konduktometrischen Messungen von Dextran	56
Abbildung 5.2: Exemplarische Abbildung der konduktometrischen Titration von Hyaluronsäure unter Zugabe von FeCl ₂ -Lösung	57
Abbildung 5.3: Ableitung der konduktometrischen Titration aus Abbildung 5.2	58
Abbildung 5.4: Exemplarische Darstellung zur Bestimmung von $\Delta\kappa$	59
Abbildung 5.5: Exemplarische Abbildung der konduktometrischen Titration von Xanthan unter Zugabe von BaCl ₂ -Lösung	63
Abbildung 5.6: Ableitung der konduktometrischen Titration aus Abbildung 5.4	64
Abbildung 5.7: Beispiel für die Ergebnisse der rotationsviskosimetrischen Messungen von Dextran	68
Abbildung 5.8: Ergebnisbeispiel für die rotationsviskosimetrischen Messungen mit Hyaluronsäurelösungen	70
Abbildung 5.9: Abbildungsbeispiel für die rotationsviskosimetrischen Messungen von Xanthanlösungen	74
Abbildung 5.10: Oberfläche einer Mica-Disk ohne Polysaccharid	79
Abbildung 5.11: Mica-Disk mit 1 mg/mL unabgebautem Xanthan beschichtet	79
Abbildung 5.12: AFM-Aufnahme von 1 mg/mL unabgebauter Hyaluronsäure	80
Abbildung 5.13: Vergrößerung aus Abbildung 5.12 mit dazugehöriger Höhenmessung	81
Abbildung 5.14: AFM-Aufnahme von 0,25 mg/mL der über drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure und der dazugehörigen Höhenmessung	82
Abbildung 5.15: AFM-Aufnahme von 1,0 mg/mL unabgebauter Hyaluronsäure in Anwesenheit von 0,002 mol/L Cu ²⁺ -Kationen	83
Abbildung 5.16: AFM-Aufnahme von 0,1 mg/mL über drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure in Anwesenheit von 0,002 mol/L Cu ²⁺ -Ionen	84

Abbildung 5.17: AFM-Aufnahme von 0,1 mg/mL über drei Stunden abgebautem Xanthan ohne Metallkationen mit dazugehöriger Höhenmessung	85
Abbildung 5.18: AFM-Aufnahme der 0,1 mg/mL über drei Stunden abgebautem Xanthan mit 0,002 mol/L Ba ²⁺ -Kationen.....	86
Abbildung 5.19: Abbildung 5.18 ohne die Beschädigung des Glimmerträgers im unteren Bereich der AFM-Aufnahme.....	87
Abbildung 5.20: Vergleich der ¹ H-Spektren verschiedener Abbaustufen der Hyaluronsäure	89
Abbildung 5.21: Vergrößerung des ¹ H-Spektrums der 17h abgebauten Hyaluronsäure	90
Abbildung 5.22: Vergleich der COSY-Spektren von unabgebauter Hyaluronsäure und drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure	91
Abbildung 5.23: Vergleich der HSQC-Spektren von unabgebauter und 3h abgebauter Hyaluronsäure.....	92
Abbildung 5.24: Vergleich der ¹ H-Spektren verschiedener Abbaustufen des Xanthans	93
Abbildung 5.25: ¹ H-Spektren des reinen 12 h abgebauten Xanthans und des 12 h abgebauten Xanthan mit 10µL Aceton	94
Abbildung 5.26: Vergleich des ¹ H-Spektrums von 26 h abgebauten Xanthan nach 0 Tagen, 1; 2; 3 und 6 Tagen mit Aceton und nach 6 Tagen mit Aceton und Essigsäure	95
Abbildung 5.27: Vergleich der ¹ H-Spektren von drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure ohne Zugabe von Kationen, sowie in Anwesenheit von Ba ²⁺ - und Ni ²⁺ -Kationen	97
Abbildung 5.28: Vergleich der ¹³ C-Spektren von drei Stunden abgebauter Hyaluronsäure ohne Zugabe von Kationen, sowie in Anwesenheit von Ba ²⁺ - und Ni ²⁺ -Kationen	99
Abbildung 5.29: Vergleich der ¹ H-Spektren von fünfzehn Stunden abgebautem Xanthan ohne Zugabe von Kationen sowie in Anwesenheit von Ba ²⁺ -, Ni ²⁺ - und Cr ³⁺ -Kationen	101
Abbildung 5.30: Vergleich der ¹³ C-Spektren von fünfzehn Stunden abgebautem Xanthan ohne Zugabe von Kationen sowie in Anwesenheit von Ba ²⁺ -, Ni ²⁺ - und Cr ³⁺ -Kationen	102
Abbildung 6.1: Exemplarische Darstellung von Hyaluronat in wässriger Lösung nach Berechnung von Haxaire et al ^[100]	107
Abbildung 6.2: Mögliche Konfiguration einer Tetrasaccharideinheit der Hyaluronsäure in wässriger Lösung.....	108

Abbildung 6.3:	Ausschnitt aus berechneten Molekülstruktur des Xanthans	112
Abbildung 6.4:	An Hand der Ergebnisse dieser Arbeit vermutete Struktur eines oktaedrischen Metall-Hyaluronatkomplexes bestehend aus zwei Tetrasaccharideinheiten	122
Abbildung 6.5:	Schematische Darstellung einer möglichen Struktur der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung des Natriumsalzes von Xanthan in wässriger Lösung ^[119]	125
Abbildung 6.6:	Schematische Darstellung einer von Tako et al. vorgeschlagenen Struktur für einen Calcium(II)-Xanthan-Komplex in wässriger Lösung ^[119]	128
Abbildung 6.7:	Schematische Darstellung einer möglichen Struktur der intermolekularen Brückenbindungen von Xanthan mit bivalenten Schwermetallkationen zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen	129
Abbildung 7.1:	An Hand der Ergebnisse dieser Arbeit postulierter oktaedrischer Metall-Hyaluronatkomplexes bestehend aus zwei Tetrasaccharideinheiten	132
Abbildung 7.2:	Struktur des sich durch die Wechselwirkungen zwischen Xanthan und den mehrwertigen Kationen bildenden Komplexes	133

Anhang B - Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Allgemeine Zusammensetzung bakterieller EPS ^[21]	8
Tabelle 2.2:	Klassifizierung von Polyelektrolyten	14
Tabelle 3.1:	verwendete Polysaccharide.....	45
Tabelle 3.2:	verwendete Chemikalien	46
Tabelle 3.3:	verwendete Geräte	47
Tabelle 4.1:	Durchgeführte konduktometrische Messungen	51/52
Tabelle 4.2:	Durchgeführte rotationsviskosimetrische Messungen.....	53
Tabelle 5.1:	Mittelwerte der Äquivalenzkonzentration $c_{\bar{A}}$ und der Stoffmenge n_K von Hyaluronsäurelösungen mit 0,05 mol/L der jeweiligen Metallsalzlösung.....	60/61
Tabelle 5.2:	Mittelwerte des stöchiometrischen Verhältnisses ($Q_{K/MP}$) und der $\Delta\kappa^*$ -Werte von den verwendeten Kationen bei der konduktometrischen Titration von Hyaluronsäure.....	61/62
Tabelle 5.3:	Mittelwerte der Äquivalenzkonzentration $c_{\bar{A}}$ und der Stoffmenge n_K der Messungen von Xanthanlösungen mit 0,05 mol/L der jeweils verwendeten Metallsalzlösung.....	65/66
Tabelle 5.4:	Mittelwerte des stöchiometrischen Verhältnisses ($Q_{K/MP}$) und der $\Delta\kappa^*$ -Werte von den verwendeten Kationen bei der konduktometrischen Titration mit Xanthan	66/67
Tabelle 5.5:	Mittelwert der Äquivalenzkonzentration ($c_{\bar{A}}$) und der Stoffmenge (n_K) der Messungen von Hyaluronsäurelösungen mit den verwendeten Metallsalz- lösungen für die rotationsviskosimetrischen Messungen	70/71
Tabelle 5.6:	Mittelwerte des stöchiometrischen Verhältnisses ($Q_{K/MP}$) für die verwendeten Kationen bei den Viskositätsmessungen mit Hyaluronsäure	72/73
Tabelle 5.7:	Ergebnisse der Langzeitmessungen der Viskosität von Hyaluronsäure- lösungen mit einer konstanten Metallkonzentration.....	73
Tabelle 5.8:	Mittelwert der Äquivalenzkonzentration ($c_{\bar{A}}$) und der Stoffmenge (n_K) der Messungen von Xanthanlösungen mit den verwendeten Metallsalz- lösungen für die rotationsviskosimetrischen Messungen	75/76
Tabelle 5.9:	Mittelwerte des stöchiometrischen Verhältnisses ($Q_{K/MP}$) für die verwendeten Kationen bei den Viskositätsmessungen mit Xanthan	76/77

Tabelle 5.10:	Ergebnisse der Langzeitmessungen der Viskosität von Xanthanlösungen mit einer konstanten Elektrolytkonzentration.....	78
----------------------	--	----

Anhang C - Messergebnisse

Konduktometrie

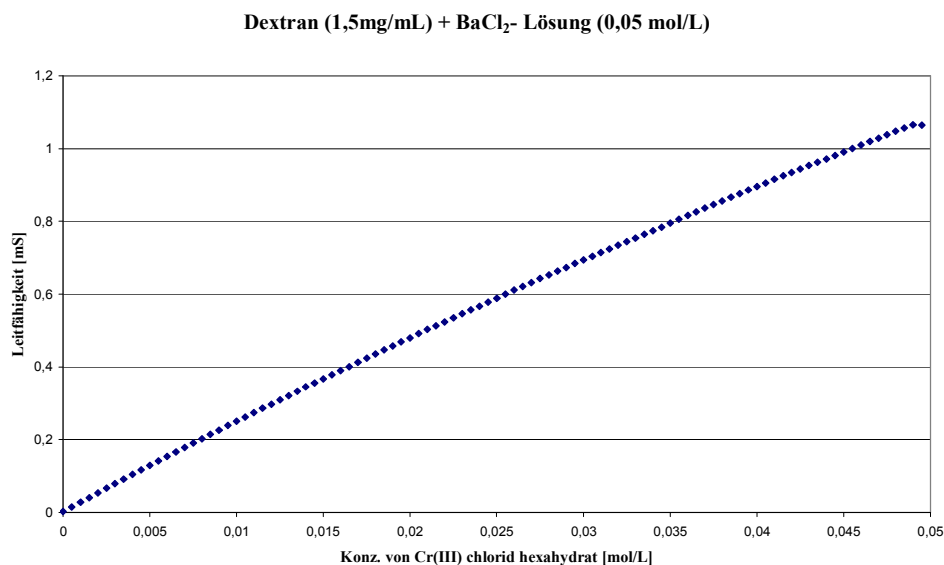


Abbildung 9.1: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Ba²⁺-Lösung.

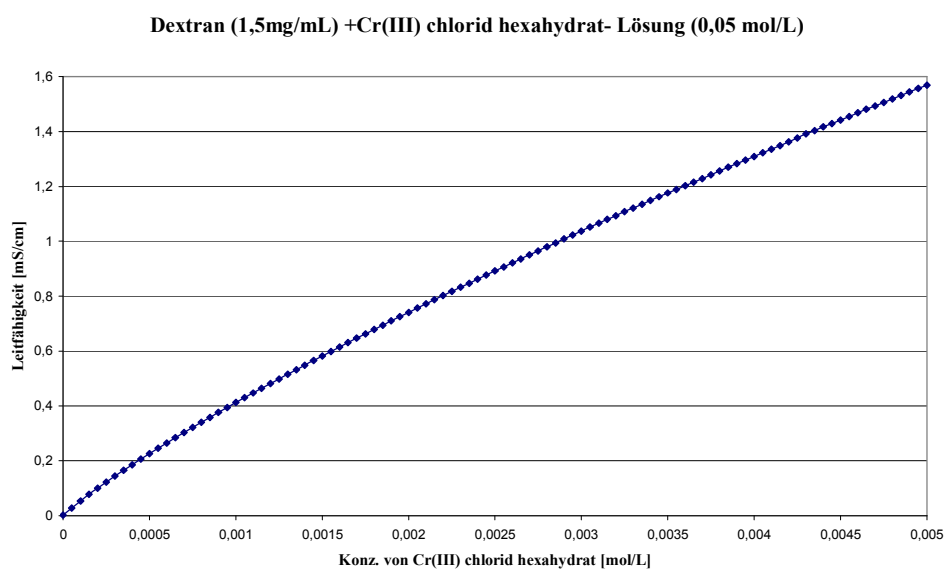


Abbildung 9.2: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Cr³⁺-Lösung.

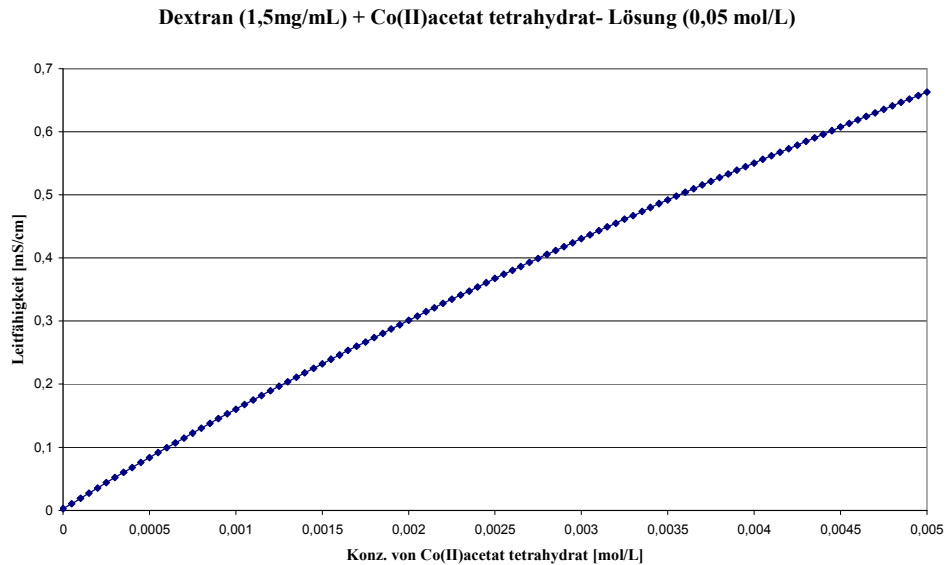


Abbildung 9.3: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Co^{2+} -Lösung.

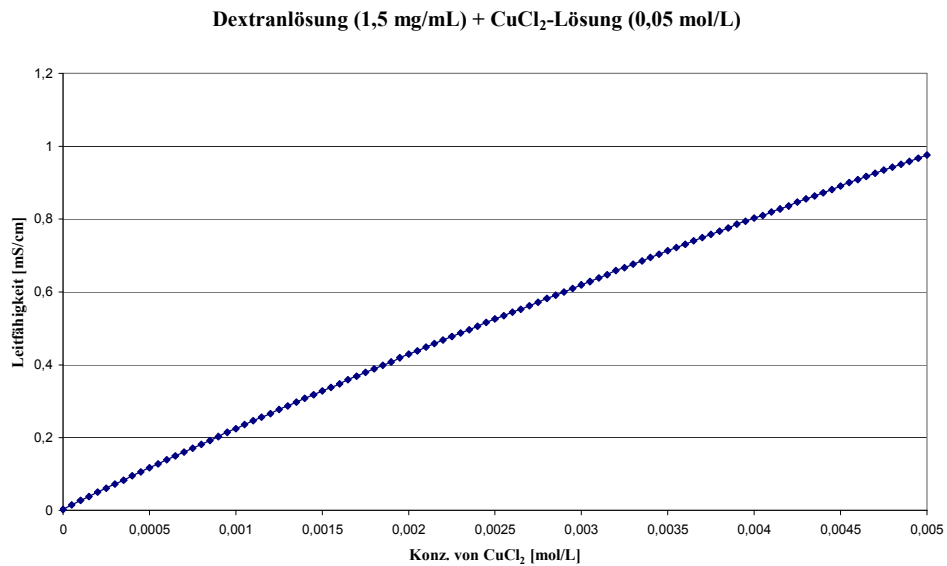


Abbildung 9.4: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Cu^{2+} -Lösung.

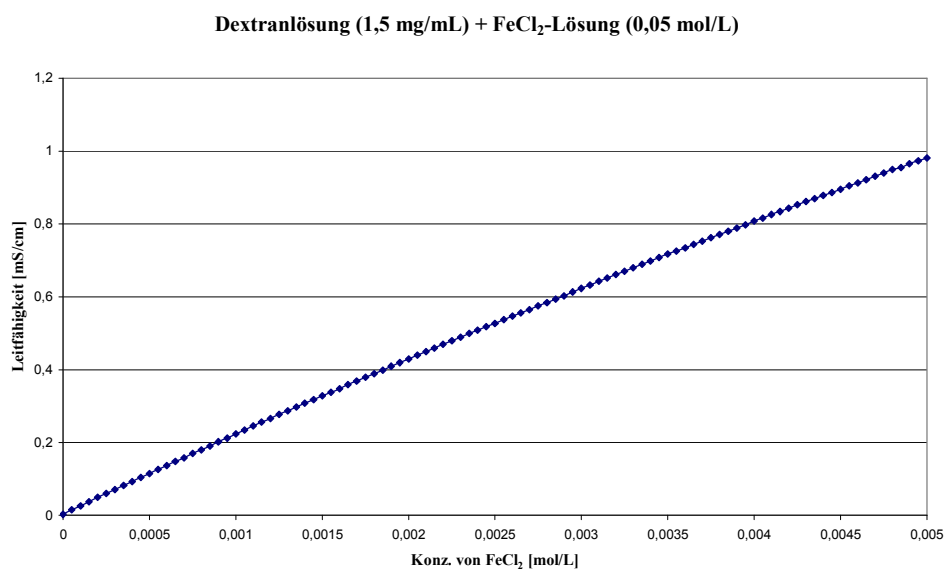


Abbildung 9.5: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Fe²⁺-Lösung.

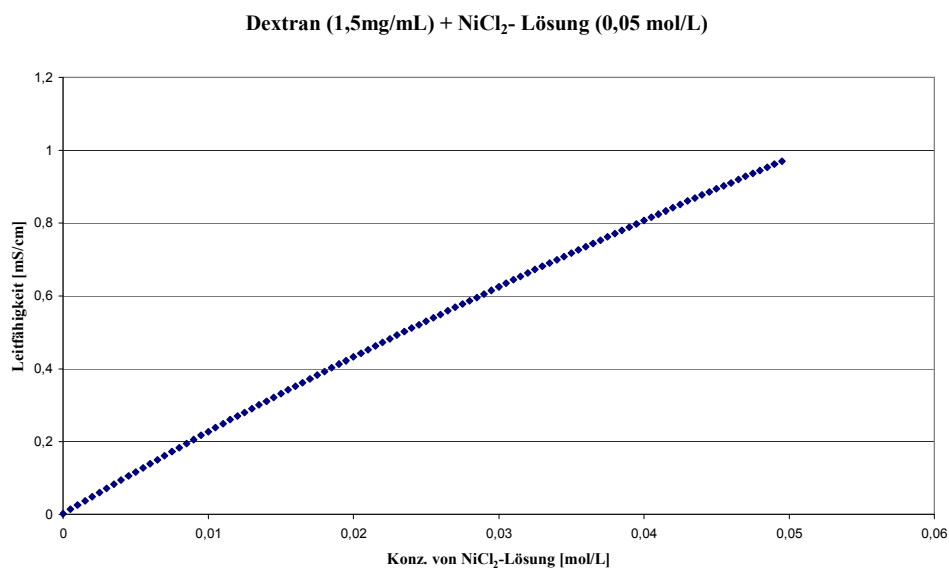


Abbildung 9.6: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Ni²⁺-Lösung.

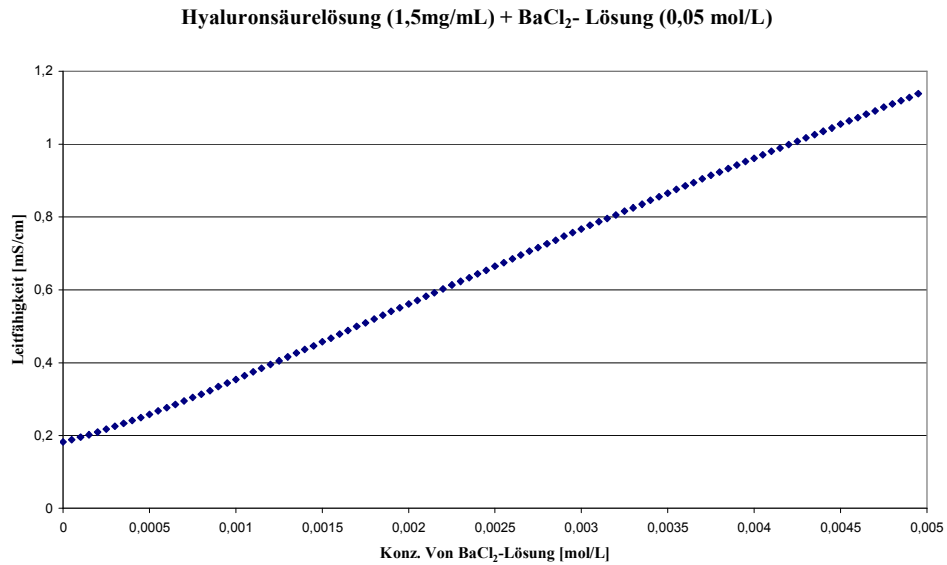


Abbildung 9.7: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Ba²⁺-Lösung.

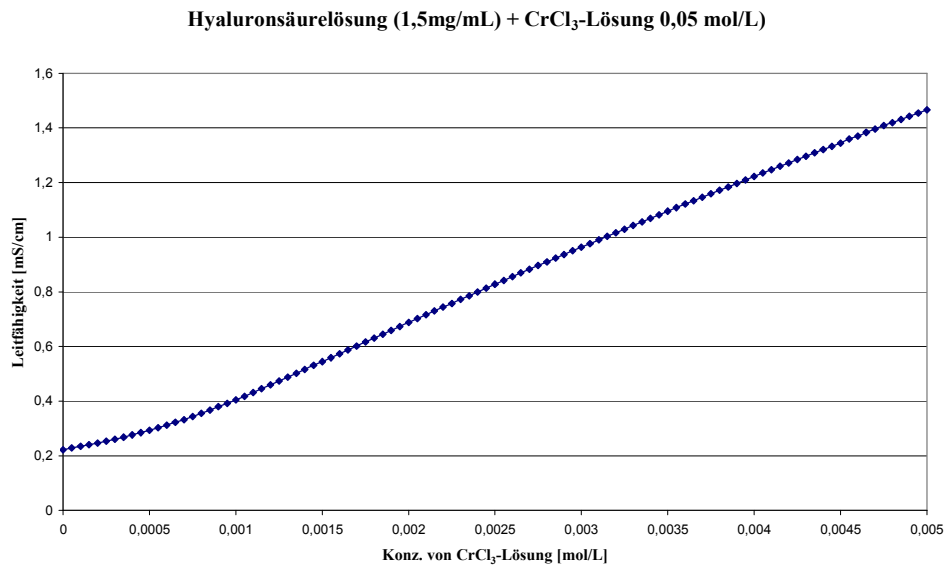


Abbildung 9.8: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Cr³⁺-Lösung.

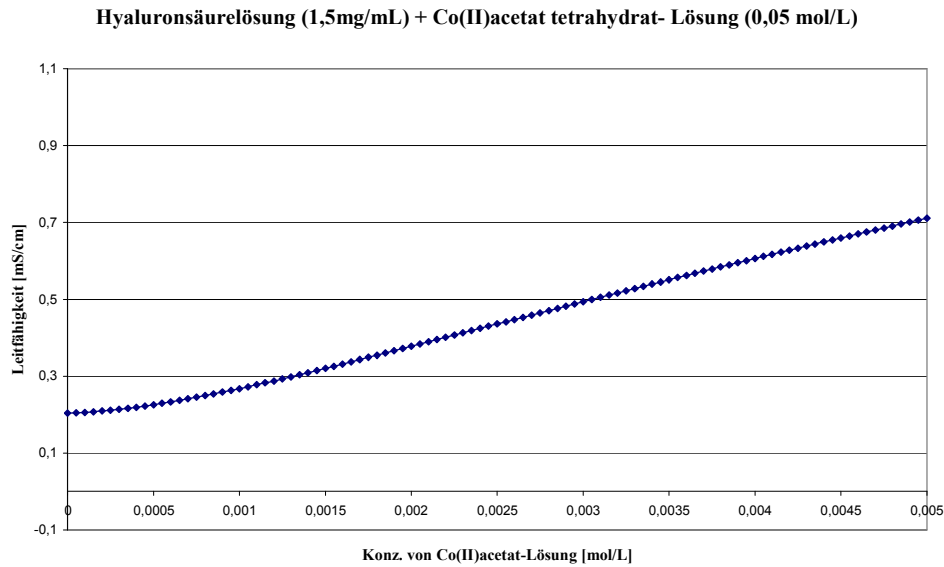


Abbildung 9.9: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Co^{2+} -Lösung.

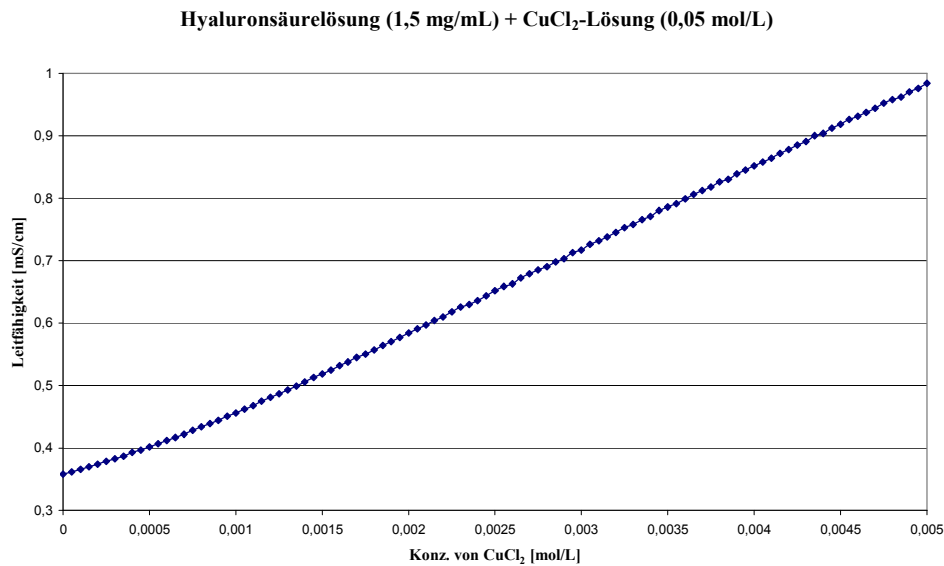


Abbildung 9.10: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Cu^{2+} -Lösung.

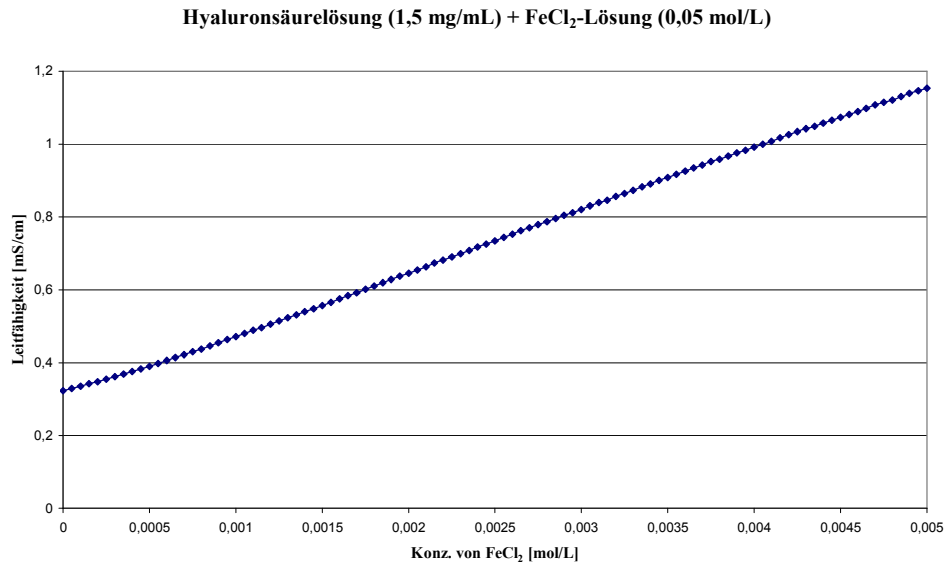


Abbildung 9.11: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Fe²⁺-Lösung.

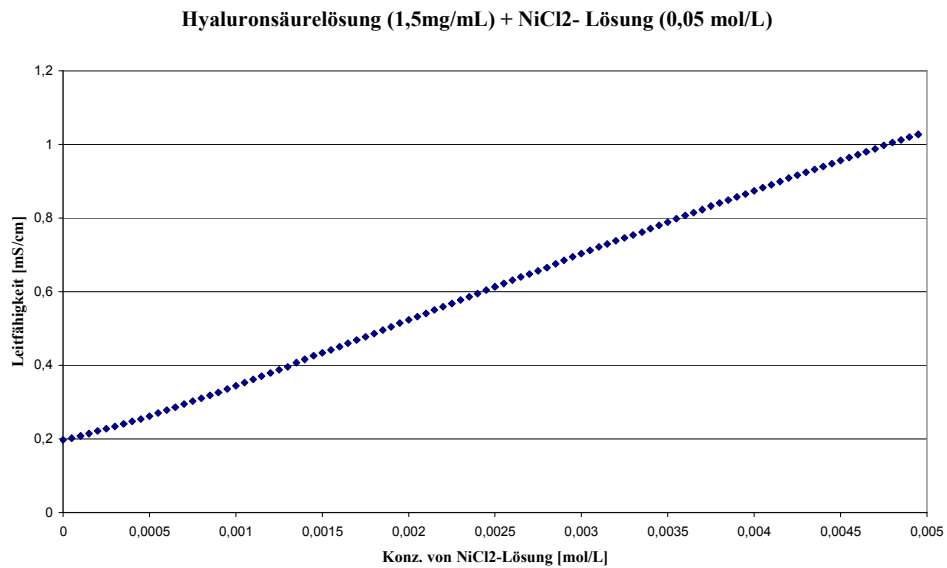


Abbildung 9.12: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Ni²⁺-Lösung.

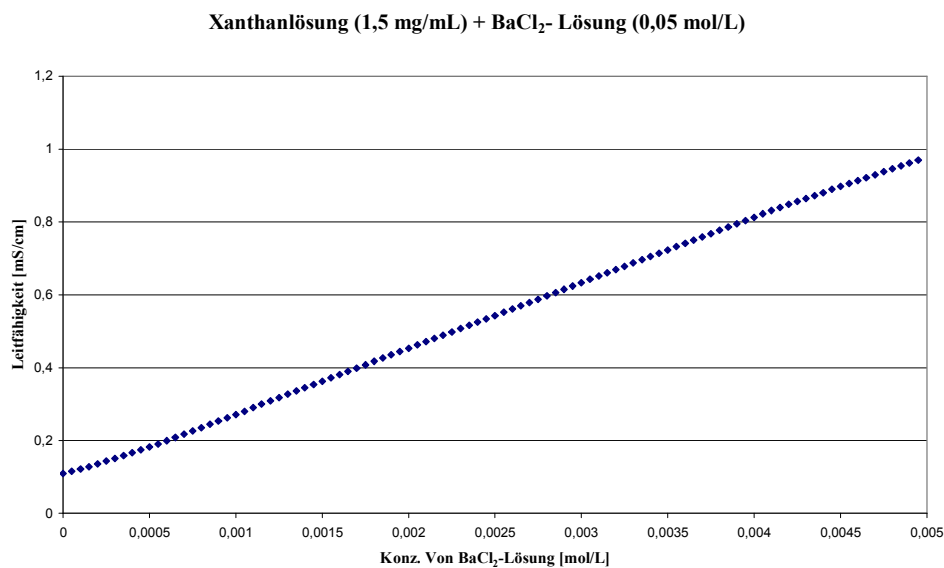


Abbildung 9.13: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Ba²⁺-Lösung.

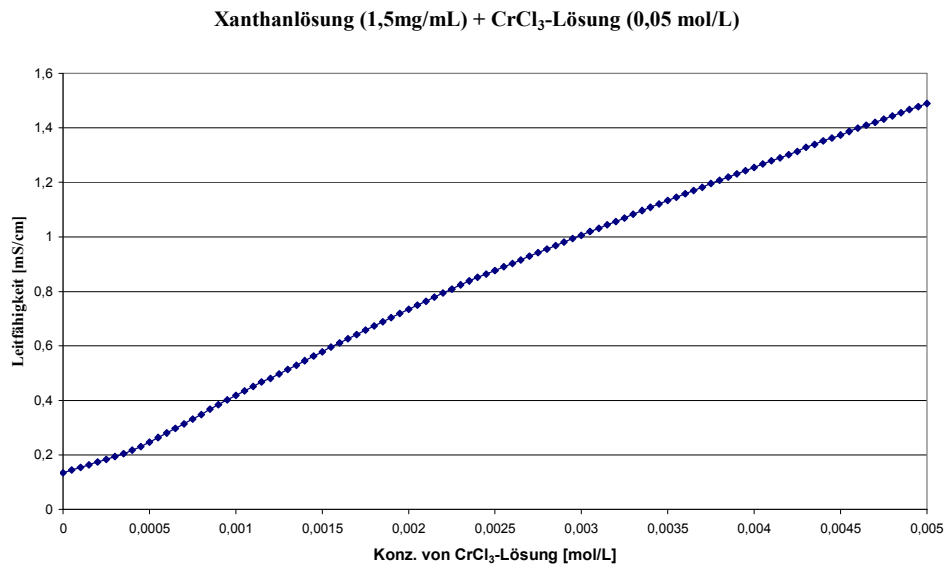


Abbildung 9.14: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Cr³⁺-Lösung.

Xanthanlösung (1,5mg/mL) + Co(II)acetat tetrahydrat-Lösung (0,05 mol/L)

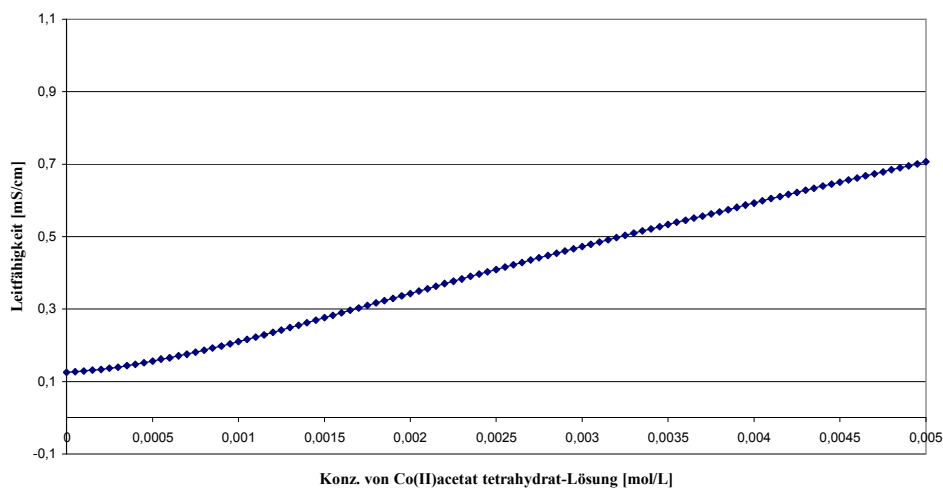


Abbildung 9.15: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Co^{2+} -Lösung.

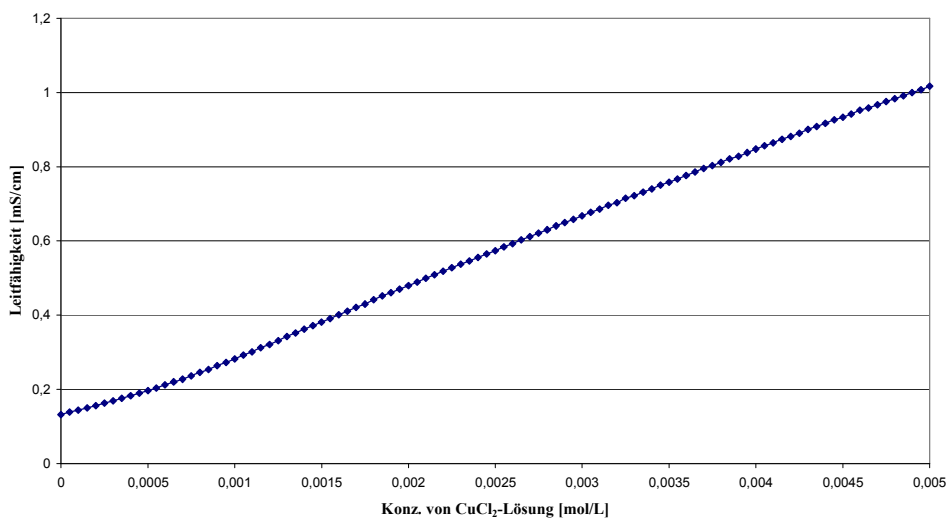
Xanthanlösung (1,5 mg/mL) + CuCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

Abbildung 9.16: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Cu^{2+} -Lösung.

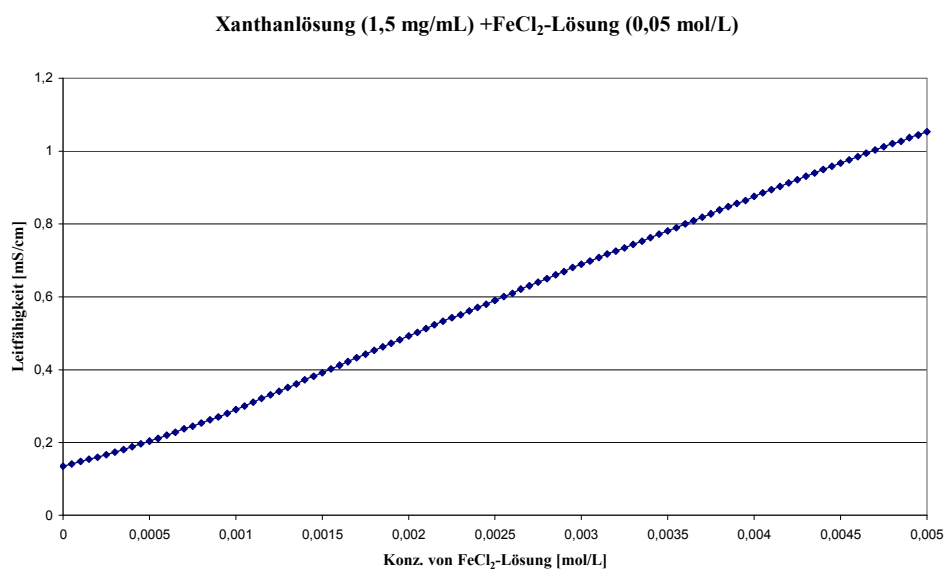


Abbildung 9.17: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Fe²⁺-Lösung.

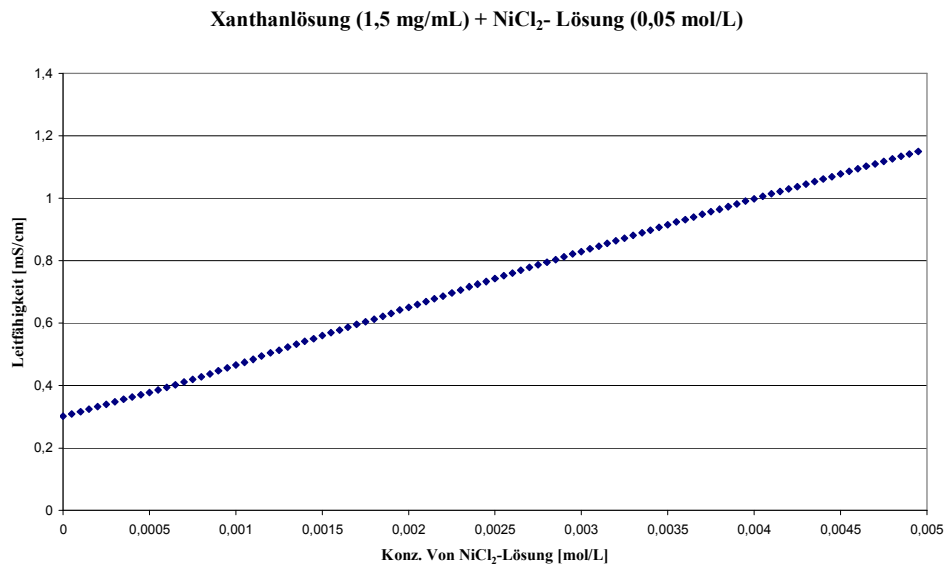


Abbildung 9.18: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Ni²⁺-Lösung.

Anpassungsfunktionen für Konduktometrie

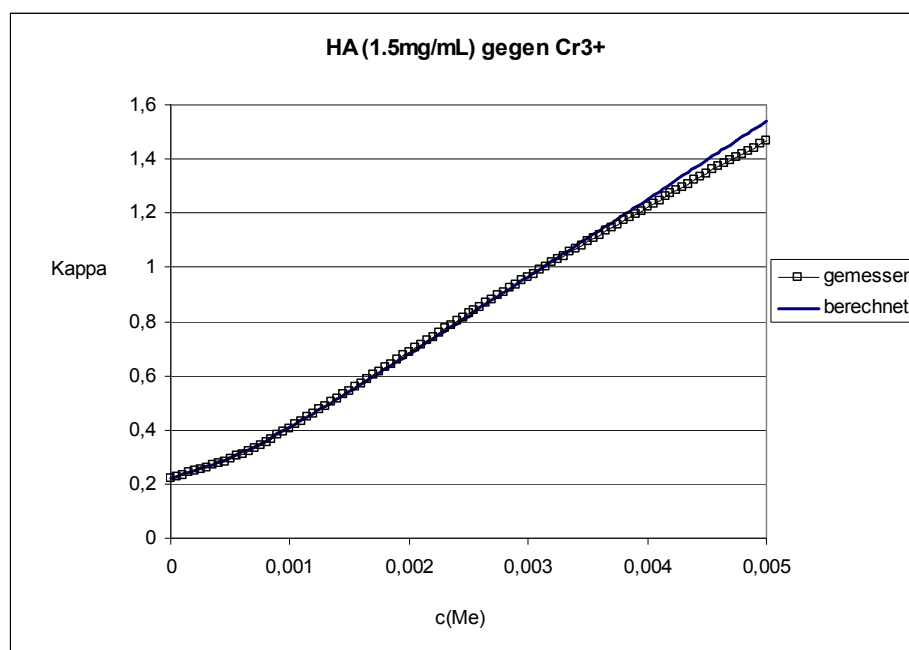


Abbildung 9.19: Exemplarische Gegenüberstellung einer berechneten und einer gemessenen Titration.

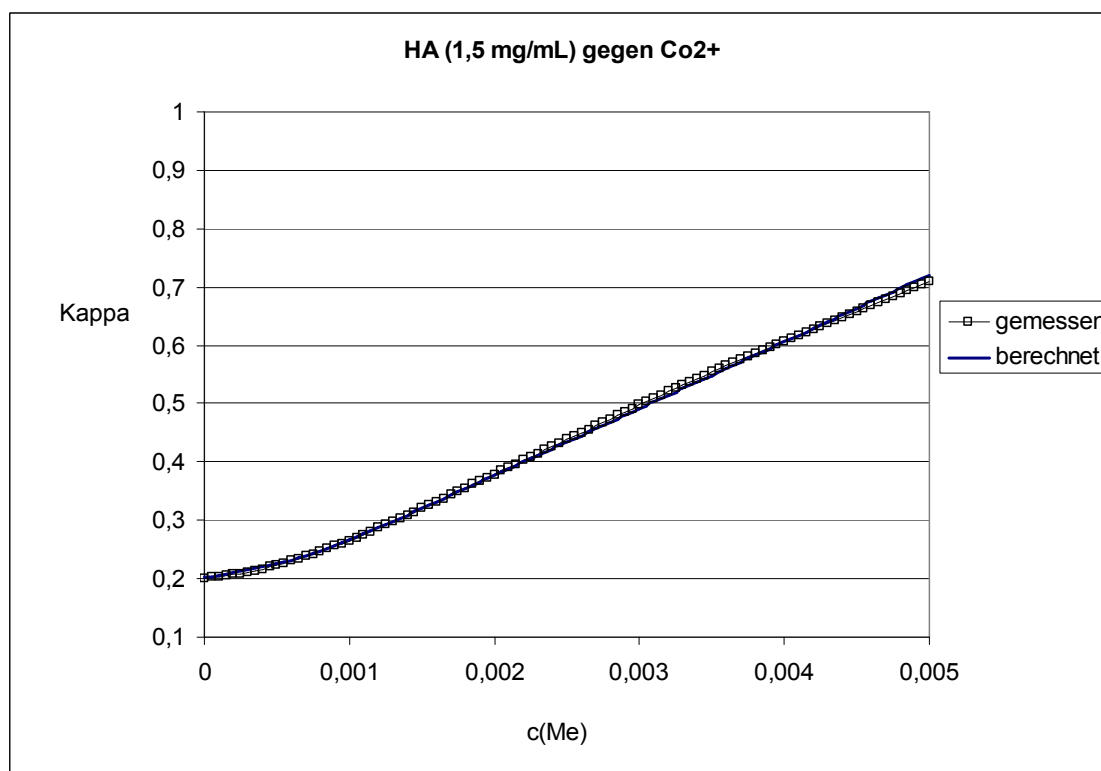


Abbildung 9.20: Exemplarische Gegenüberstellung einer berechneten und einer gemessenen Titration.

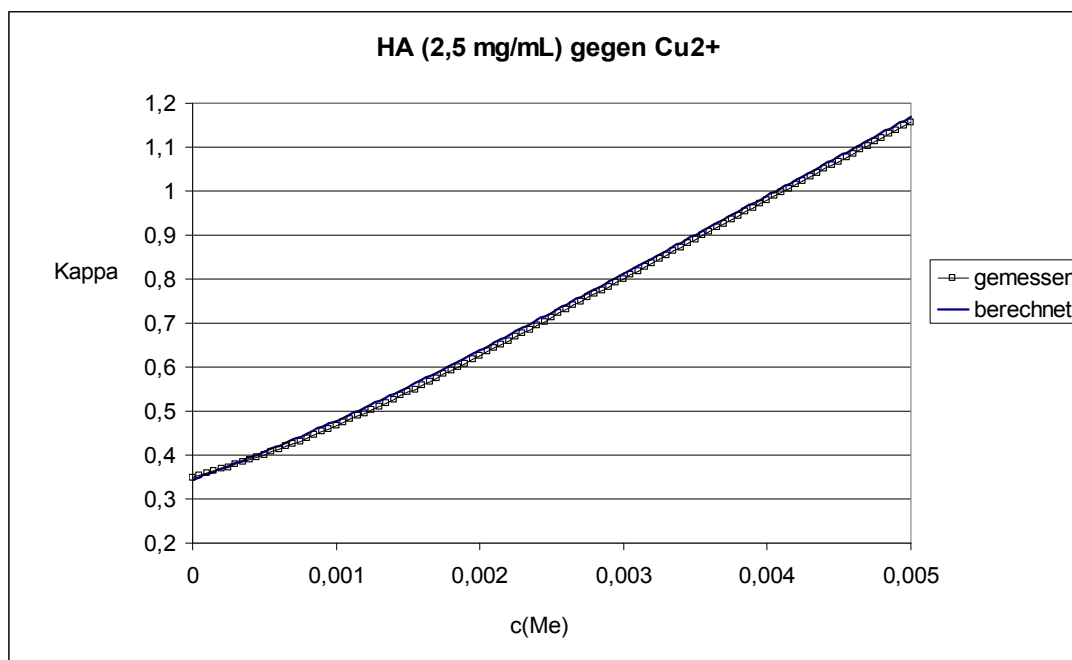


Abbildung 9.21: Exemplarische Gegenüberstellung einer berechneten und einer gemessenen Titration.

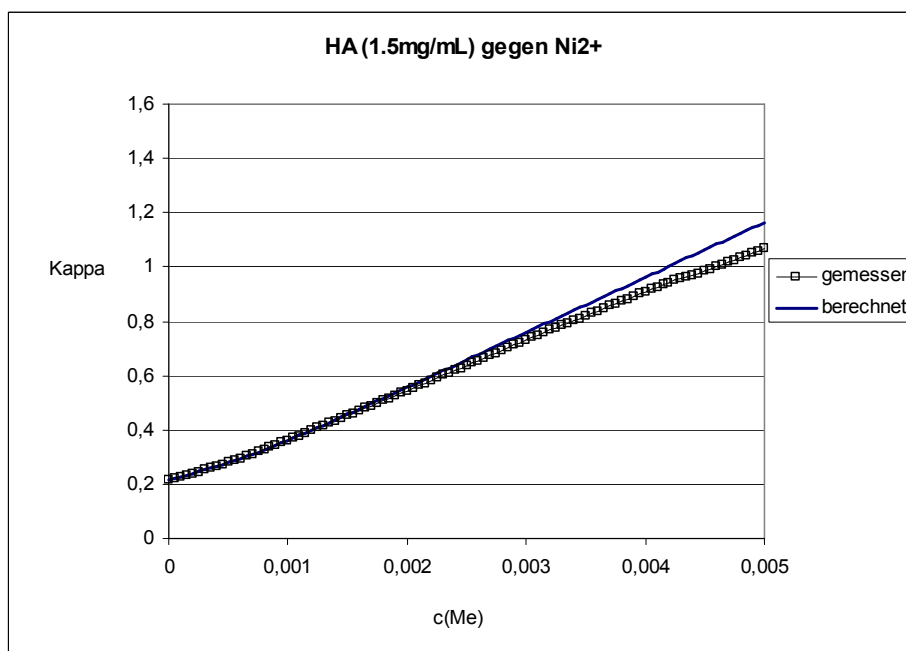


Abbildung 9.22: Exemplarische Gegenüberstellung einer berechneten und einer gemessenen Titration.

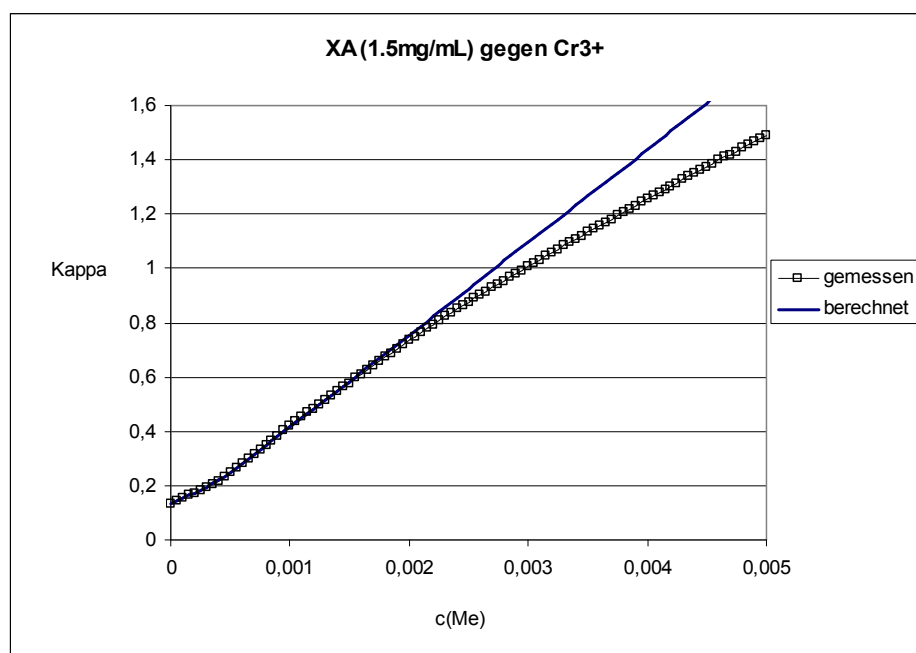


Abbildung 9.23: Exemplarische Gegenüberstellung einer berechneten und einer gemessenen Titration.

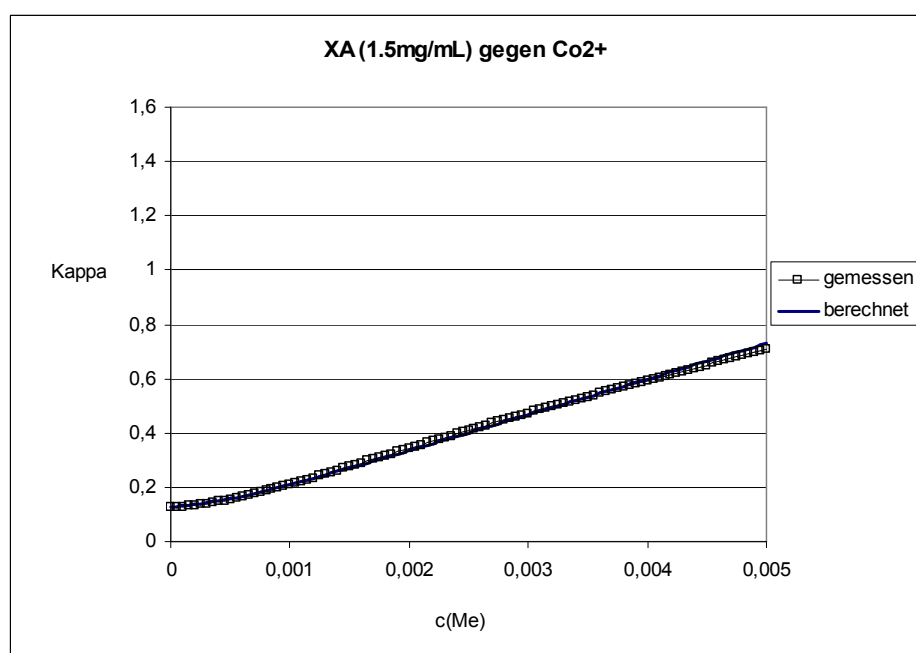


Abbildung 9.24: Exemplarische Gegenüberstellung einer berechneten und einer gemessenen Titration.

Rotationsviskosimetrie

Viskositätsänderung einer Dextranlösung (1,5 mg/mL)
bei der Zugabe einer BaCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

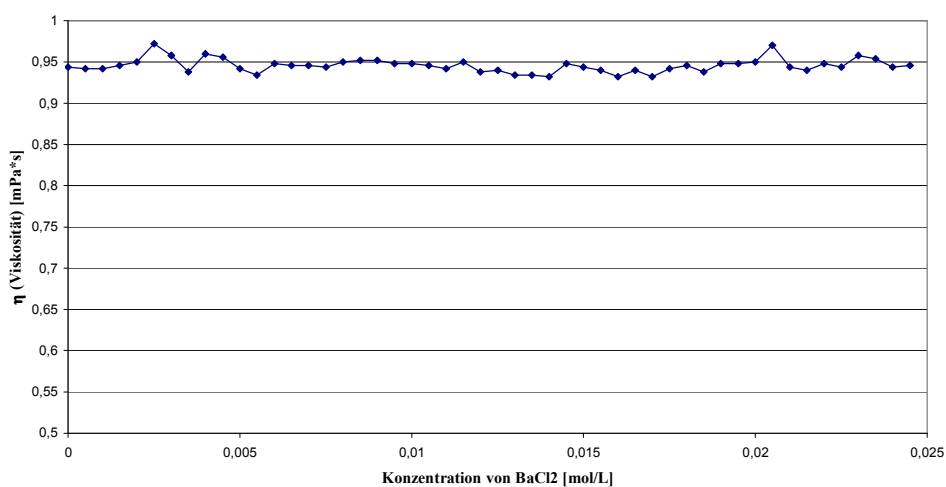


Abbildung 9.25: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Ba^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Dextranlösung (1,5 mg/mL)
bei Zugabe einer CrCl_3 -Lösung (0,05 mol/L)

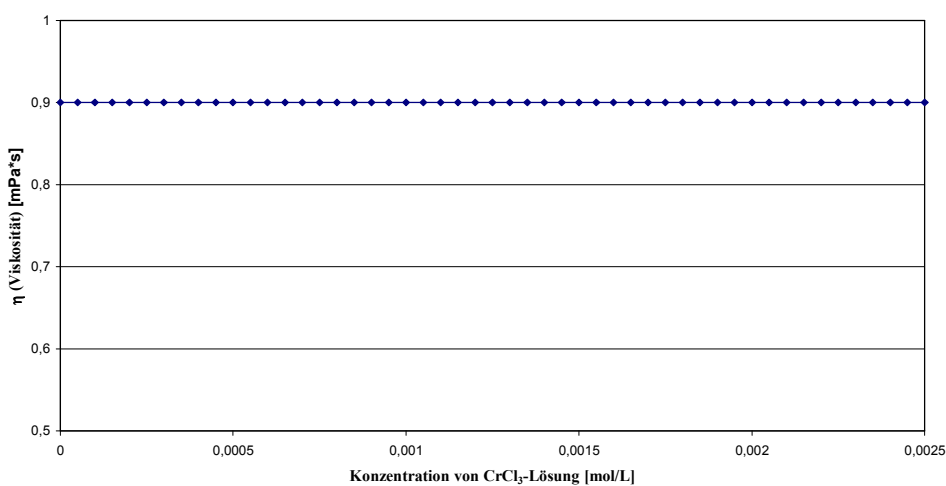


Abbildung 9.26: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Cr^{3+} -Lösung.

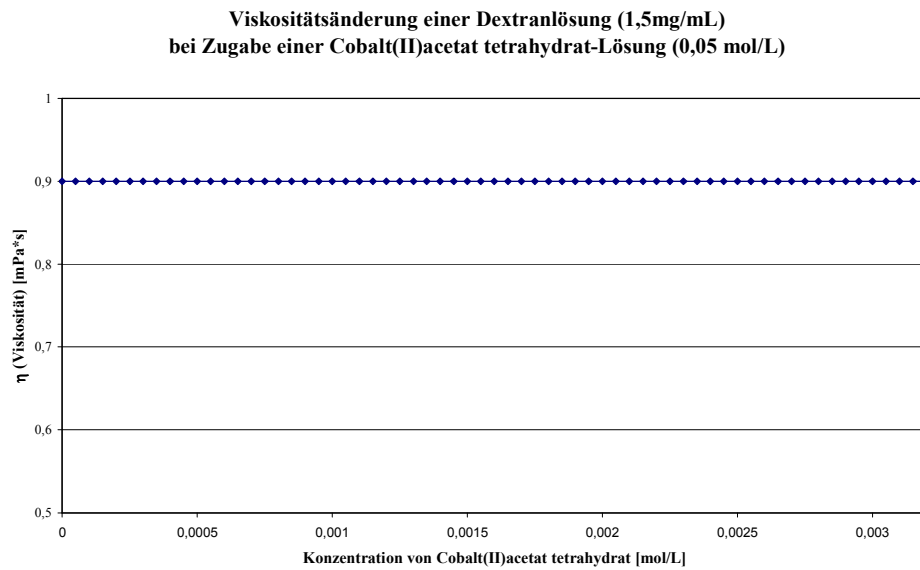


Abbildung 9.27: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Co^{2+} -Lösung.

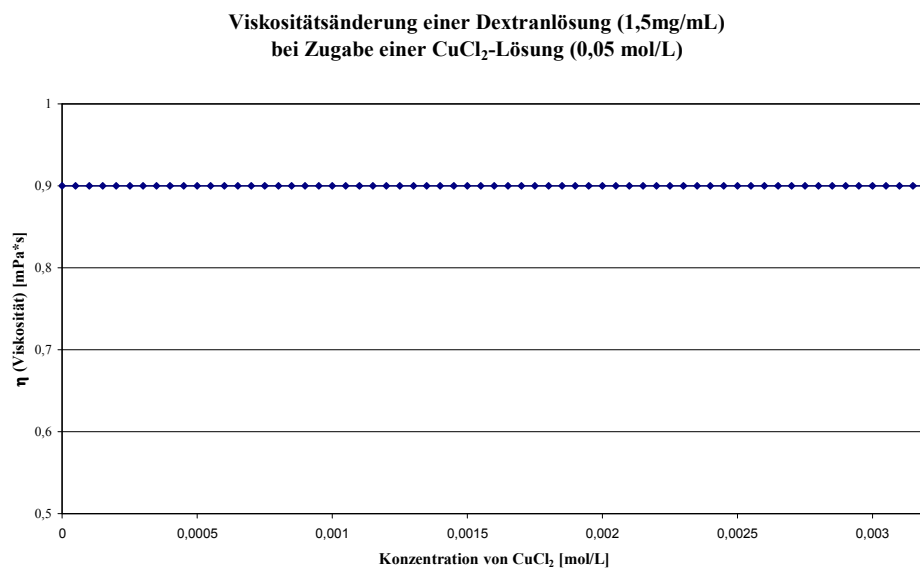


Abbildung 9.28: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Cu^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Dextranlösung (1,5mg/mL)
bei Zugabe einer FeCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

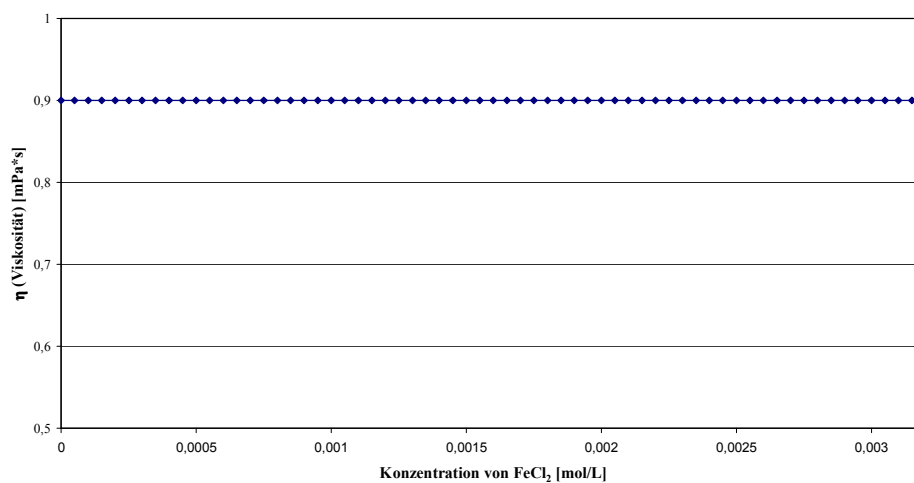


Abbildung 9.29: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Fe^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Dextranlösung (1,5 mg/mL)
bei der Zugabe einer NiCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

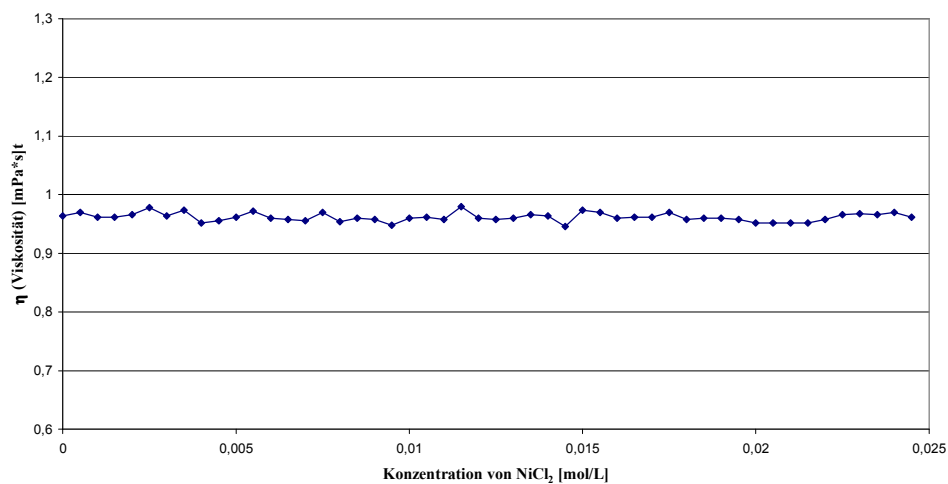


Abbildung 9.30: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Dextranlösung mit einer Ni^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Hyaluronsäurelösung (1,5 mg/mL)
bei der Zugabe einer BaCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

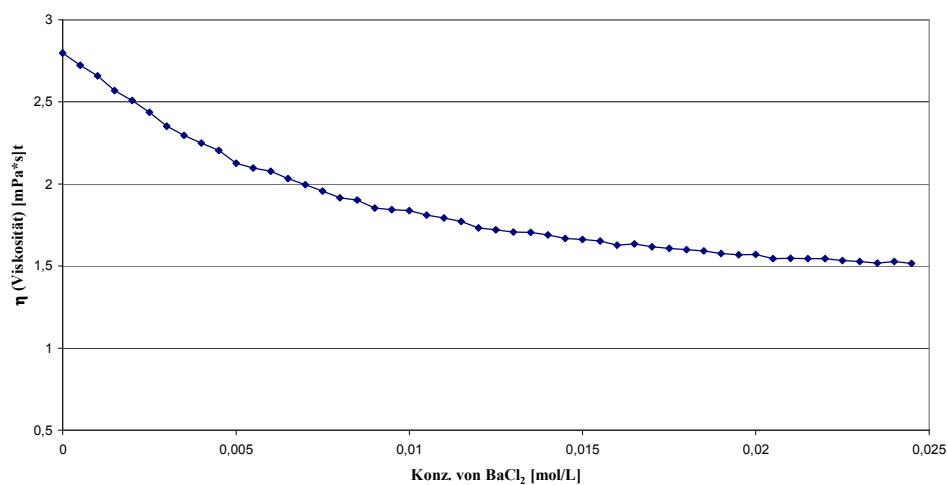


Abbildung 9.31: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Ba^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Hyaluronsäurelösung (1,5 mg/mL)
bei Zugabe einer CrCl_3 -Lösung (0,05 mol/L)

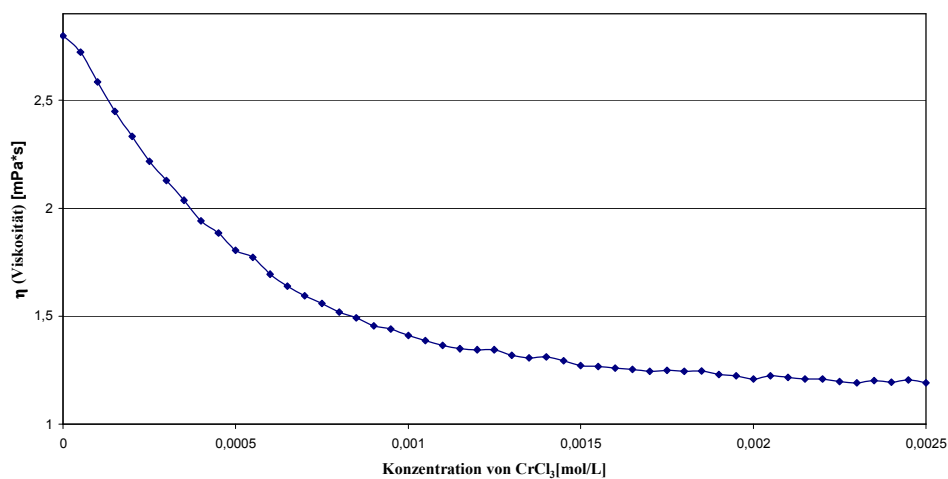


Abbildung 9.32: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Cr^{3+} -Lösung.

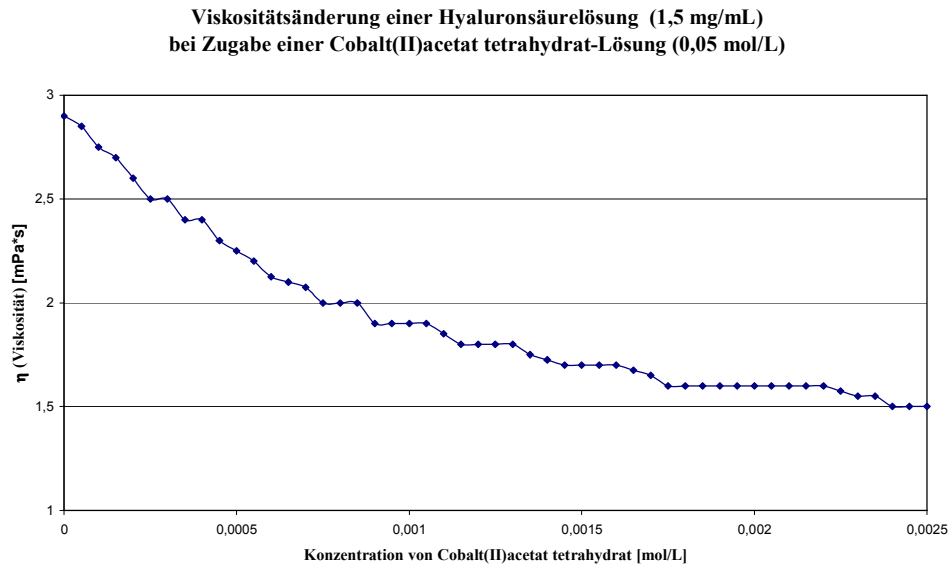


Abbildung 9.33: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Co^{2+} -Lösung.

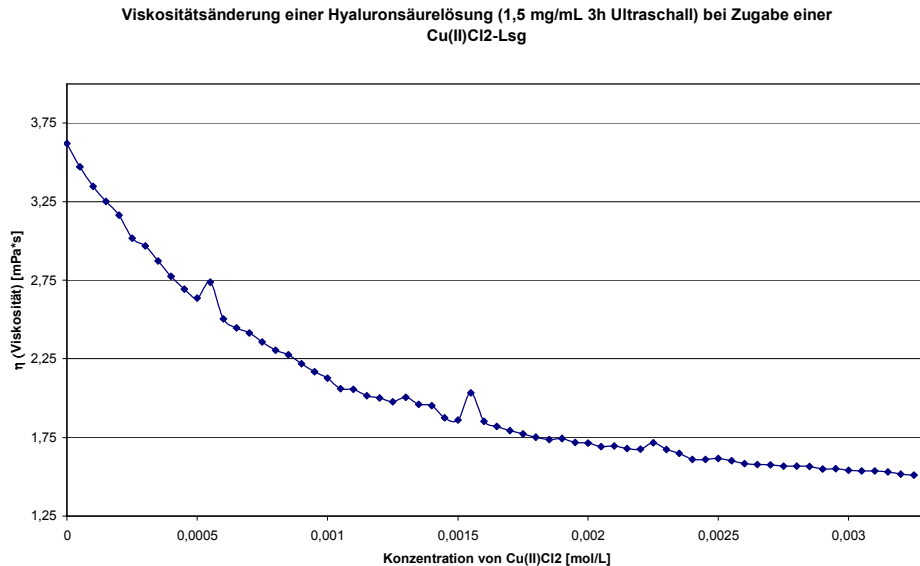


Abbildung 9.34: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Cu^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Hyaluronsäurelösung (1,5mg/mL)
bei Zugabe einer FeCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

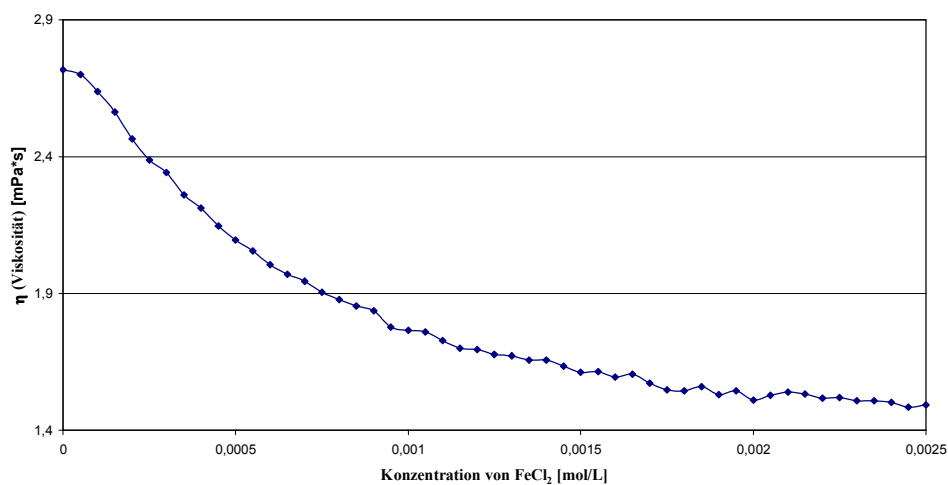


Abbildung 9.35: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Fe^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Hyaluronsäurelösung (1,5 mg/mL)
bei der Zugabe einer NiCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

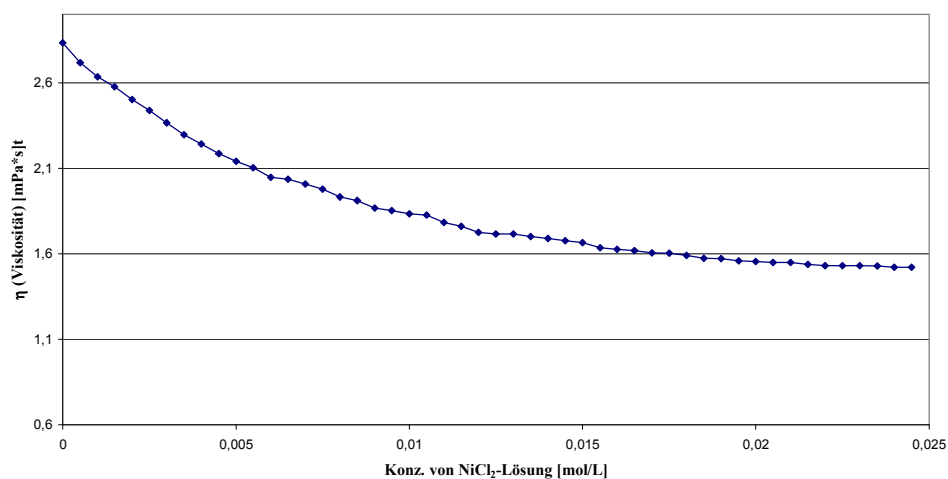


Abbildung 9.36: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Hyaluronsäurelösung mit einer Ni^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Xanthanlösung (1,5 mg/mL)
bei der Zugabe einer BaCl₂-Lösung (0,05 mol/L)

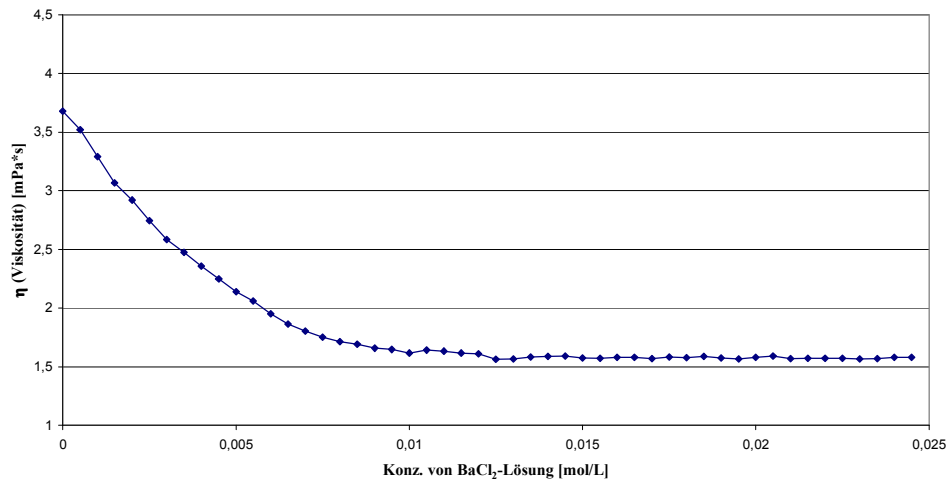


Abbildung 9.37: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Ba²⁺-Lösung.

Viskositätsänderung einer Xanthanlösung (1,5mg/mL)
bei Zugabe einer CrCl₃-Lösung (0,05 mol/L)

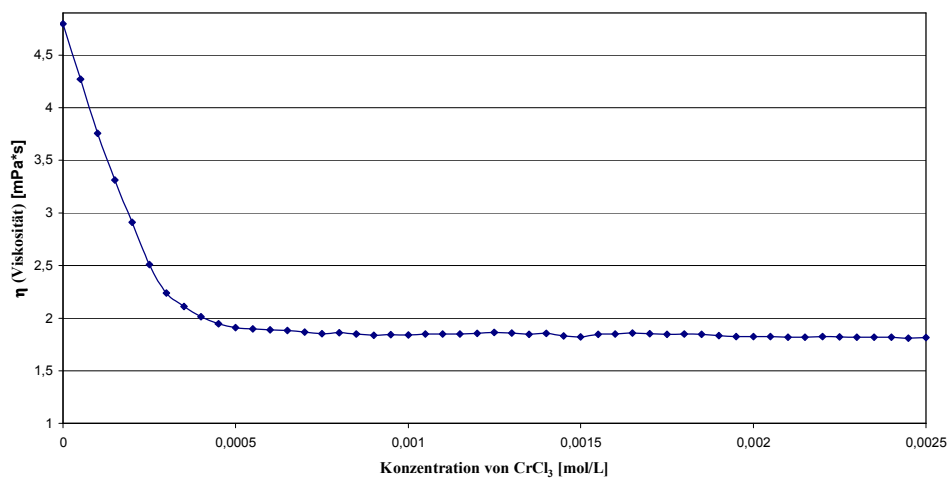


Abbildung 9.38: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Cr³⁺-Lösung.

Viskositätsänderung einer Xanthanlösung (1,5mg/mL)
bei Zugabe einer Co(II)acetat tetrahydrat-Lösung (0,05 mol/L)

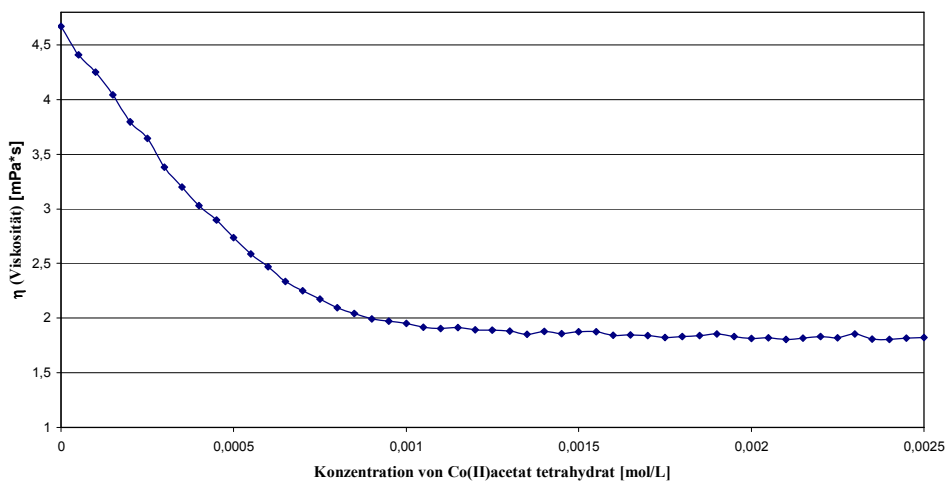


Abbildung 9.39: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Co^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Xanthanlösung (1,5mg/mL)
bei Zugabe einer CuCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

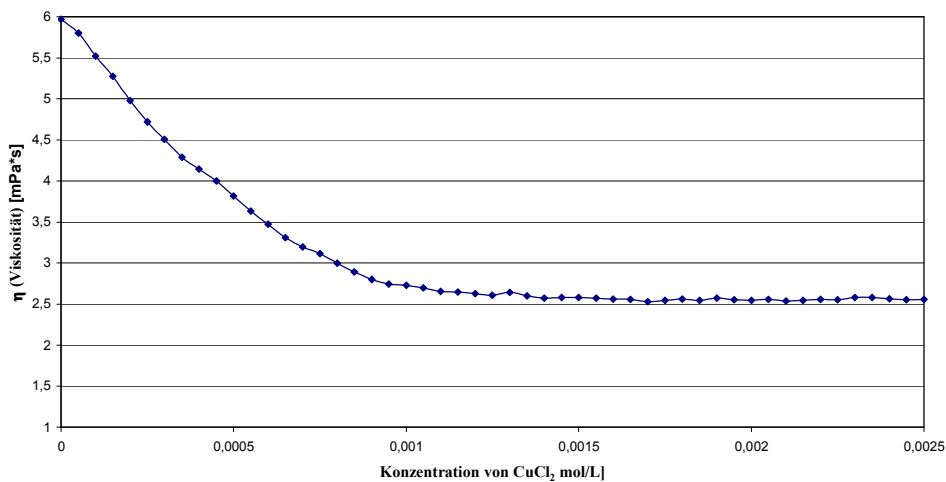


Abbildung 9.40: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Cu^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Xanthanlösung (1,5 mg/mL)
bei der Zugabe einer FeCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

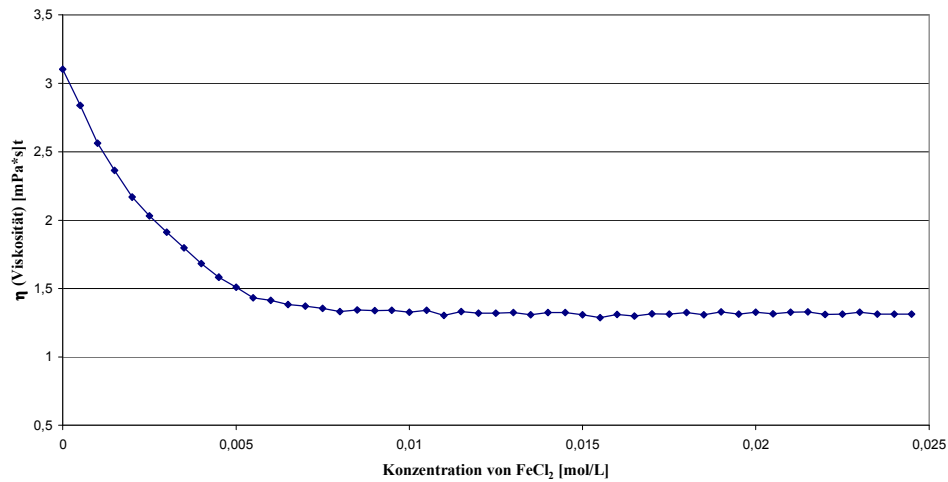


Abbildung 9.41: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Fe^{2+} -Lösung.

Viskositätsänderung einer Xanthanlösung (1,5 mg/mL)
bei der Zugabe einer NiCl_2 -Lösung (0,05 mol/L)

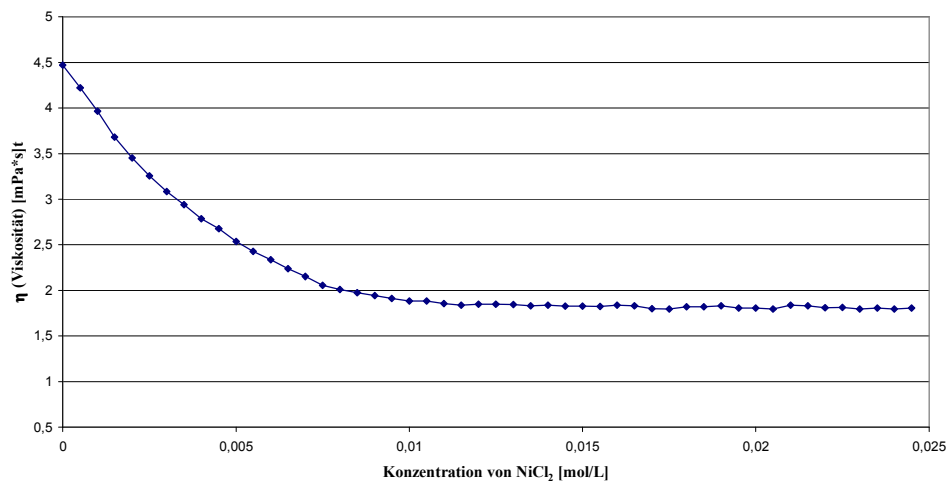


Abbildung 9.42: Exemplarische Abbildung für eine Titration von 1,5 mg/mL Xanthanlösung mit einer Ni^{2+} -Lösung.

CURRICULUM VITAE

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe verfasst zu haben und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Essen, 29. Juli 2010

(Dirk Bergmann)